



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Καθαρισμός β-γλυκοζιδάσης από το μύκητα Raecilotomyces variotii

Σισμάνη Δανάη

Επιβλέπων καθηγητής: Δημήτρης Κέκος, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα 2019

Αθήνα, Φεβρουάριος 2019

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δημήτρη Κέκο, τον κύριο Δημήτρη Χατζηνικολάου, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου και τη Δρ. Διομή Μαμμά για τη βοήθεια και την καθοδήγηση που μου προσέφεραν, κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ακόμα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για το άψογο κλίμα και συνεργασία που είχαμε σε όλο το διάστημα της παρουσίας μου στο εργαστήριο. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα φιλικά και συγγενικά μου πρόσωπα, για την στήριξή τους τους τελευταίους μήνες.

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract.....	6
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ	7
1. Εισαγωγή	8
2. Ταξινόμηση των β-γλυκοζιδασών.....	9
2.1 Εντοπισμός των β-γλυκοζιδασών	12
2.2 Δομές β-γλυκοζιδάσης.....	13
3. Καταλυτικός μηχανισμός της β-γλυκοζιδάσης	15
4. Παραγωγή μικροβιακής β-γλυκοζιδάσης	17
4.1 Παράμετροι Παραγωγής	20
5. Καθαρισμός της β-γλυκοσιδάσης.....	25
5.1 Χαρακτηριστικά β-γλυκοζιδασών.....	26
6. Εφαρμογές β-γλυκοζιδασών.....	34
6.1. Εφαρμογές με βάση την υδρολυτική δράση.....	34
6.2. Εφαρμογές με βάση τη συνθετική δράση των γλυκοζιδασών	37
ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	38
1. Όργανα.....	39
2. Μικροοργανισμοί	39
3. Αερόβια ανάπτυξη του μύκητα <i>Paecilomyces variotii</i> και παραγωγή κυτταρινασών σε βυθισμένη καλλιέργεια	39
4. Εμβόλιο	40
5. Μέτρηση ενεργότητας ενζύμων	40
5.1. Μέτρηση ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης	40
5.2. Μέτρηση ενεργότητας ενδογλουκανάσης	41
5.3. Μέτρηση ενεργότητας εξωγλουκανάσης.....	41
5.4. Μέτρηση ενεργότητας κυτταρινασών.....	41
6. Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων.....	41
7. Καμπύλη αναφοράς p-νιτροφαινόλης.....	42
8. Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit)	43
9. Μέτρηση πρωτεΐνης	44
10. Απομόνωση του ενζύμου	44
10.1. Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο	44

10.2 Διαπίδυση.....	45
10.3 Χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής	45
10.4 Χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.....	45
10.5 Συμπύκνωση	45
11. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.....	46
11.1. Εμφάνιση των πρωτεϊνών στην ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου	46
12. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα και την σταθερότητα του ενζύμου	47
13. Επίδραση του pH στην ενεργότητα και την σταθερότητα του ενζύμου	47
14. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών	48
15. Παρεμπόδιση από το προϊόν.....	48
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
1. Παραγωγή β-γλυκοζιδάσης από το μύκητα <i>Paecilomyces variotii</i>	50
1.1 Επίδραση της πηγής άνθρακα	50
1.2 Επίδραση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα	51
2. Χαρακτηριστικά ακατέργαστου ενζυμικού σκευάσματος.....	53
3. Απομόνωση β-γλυκοζιδάσης	55
3.1 Χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής	55
3.2 Χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων	56
4. Χαρακτηρισμός β-γλυκοζιδάσης	58
4.1 Προσδιορισμός μοριακού βάρους β-γλυκοζιδάσης.....	58
4.2 Βέλτιστη θερμοκρασίας και βέλτιστο pH δράσης της β-γλυκοζιδάσης	59
5. Σταθερότητα β-γλυκοζιδάσης σε διάφορες τιμές pH.....	61
6. Θερμική σταθερότητα της β-γλυκοζιδάσης.....	61
6. Υπολογισμός κινητικών σταθερών	70
7. Αναστολή από την γλυκόζη	72
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε μια β-γλυκοζιδάση από τον μύκητα *Paecilomyces variotti*. Η αερόβια ανάπτυξη του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε σε βυθισμένη ζύμωση και μελετήθηκε η επίδραση του είδους της πηγής άνθρακα (άχυρο σίτου, άχυρο κριθαριού, άξονας σπάδικα αραβόσιτου, πίτυρο σίτου, αλκαλικά προκατεργασμένο άχυρο σίτου και αλκαλικά προκατεργασμένος άξονα σπάδικα αραβόσιτου) στην παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης. Ο άξονας σπάδικα αραβόσιτου αποδείχθηκε η βέλτιστη πηγή άνθρακα σε συγκέντρωση 4% β/ο.

Η απομόνωση της β-γλυκοζιδάσης πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας αρχικά καταβύθιση των πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο και στη συνέχεια χρωματογραφικές τεχνικές, χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής και χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η διαδικασία απομόνωσης οδήγησε σε ανάκτηση του 25.3% του αρχικού ενζύμου. Ακολούθησε μελέτη των ιδιοτήτων του καθαρού ενζύμου η οποία περιελάμβανε την εύρεση του μοριακού του βάρους, των συνθηκών pH και θερμοκρασίας που επηρεάζουν τη σταθερότητα και δράση του ενζύμου, την εύρεση των κινητικών σταθερών σε υπόστρωμα κελλοβιόζη και pNPG καθώς και την αναστολή από τη γλυκόζη.

Το μοριακό βάρος της β-γλυκοζιδάσης προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και βρέθηκε ίσο με 110 kDa. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την δράση του ενζύμου είναι 60 °C και η βέλτιστη τιμή pH είναι 4.5. Το ένζυμο διατηρεί το 80% της ενεργότητάς του κατά την επώασή του σε pH 4.5-6.0 στους 4 °C για 24 ώρες. Στους 30 °C, 40 °C και 50 °C διατηρεί το 90%, 85% και 55% της ενεργότητάς του αντίστοιχα μετά από 8 ώρες παραμονής στην κάθε θερμοκρασία. Στους 60 °C το ένζυμο απενεργοποιείται πλήρως μετά από 100 λεπτά παραμονής, ενώ στους 70 °C και τους 80 °C μετά από 10 λεπτά παραμονής. Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης βρέθηκε ίση με 139.02 kJ.mol⁻¹. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής του ενζύμου στους 70 και 80°C υπολογίσθηκαν ίσοι με 5.7 και 3.7 min, αντίστοιχα, ενώ στους 50 °C βρέθηκε ίσος με 8.9 ώρες. Οι τιμές των χρόνων υποδεκαπλασιασμού (D-value) στους 70 και 80°C έδειξαν ότι προκειμένου να μειωθεί η αρχική ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης κατά 90% απαιτούνται 18.8 και 12.3 min, αντίστοιχα. Με τη βοήθεια των

υπολογισθέντων τιμών της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης (E) και των σταθερών θερμικής απενεργοποίησης (k_d) υπολογίσθηκαν οι μεταβολές των θερμοδυναμικών μεγεθών, ενθαλπία (ΔH^*), εντροπία (ΔS^*) και ελεύθερη ενέργεια Gibbs (ΔG^*).

Τέλος, υπολογίσθηκαν οι κινητικές σταθερές K_m και V_{max} για τα υποστρώματα pNPG και κελλοβιόζη. Οι τιμές των σταθερών είναι 0.68 mM και 4.52 mmole/mg protein/min και 3.45 mM και 0.058 mmole/mg protein/min για το pNPG και την κελλοβιόζη αντίστοιχα. Η γλυκοζιδάση παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση στο pNPG σε σχέση με την κελλοβιόζη, όπως προκύπτει από το λόγος καταλυτικής αποδοτικότητας k_{cat}/K_m , ο οποίος είναι πολύ μεγαλύτερος στο pNPG (12186.3 για το pNPG και 156.4 για την κελλοβιόζη). Από την εξέταση παρεμπόδισης του ενζύμου από το προϊόν βρέθηκε ότι το ένζυμο παρεμποδίζεται ισχυρά από την γλυκόζη.

Abstract

In the present thesis, a β -glucosidase from the fungus *Paecilomyces variotti* was isolated. Aerobic growth of the microorganism was performed in submerged fermentation (SMF). The effect of carbon source i.e. wheat straw, barley straw, corn cobs, wheat bran, alkaline pre-treated wheat straw and alkaline pre-treated corn cobs on β -glucosidase production was investigated. Corn cobs proved to be the optimal carbon source at a concentration of 4% w/ v.

Purification of β -glucosidase was carried out applying ammonium sulfate fractionation, ion exchange and hydrophobic interaction chromatography. 25.3% of the original enzyme was retrieved which was then characterized. The molecular mass of the purified PGM was estimated by SDS-PAGE at 110 kDa.

The specific activity of β -glucosidase, after the final chromatographic step, was 5.6 Units/mg protein, the total yield 25.3% and the enzyme was purified 11-fold.

The optimal temperature for enzyme activity is 60 °C and the optimum pH value is 4.5. The enzyme retained about 80% of its activity at pH from 4.5 to 6.0 at 4 °C after 24 hours. At 30°C, 40°C and 50°C it retained 90%, 85% and 55% of its initial activity respectively after 8 hours of incubation. At 60°C the enzyme is completely deactivated after 100 minutes of incubation, while at 70°C and 8 °C after 10 minutes of incubation. Thermal inactivation energy was found to be 139.02 kJ.mol⁻¹. The half-life of the enzyme at 70°C and 80°C was calculated at 5.7 and 3.7 min respectively, while at 50°C it was equal to 8.9 hours. The values of D-value at 70°C and 80°C showed that in order to reduce the initial β -glucosidase activity by 90% required 18.8 and 12.3 min, respectively. From the calculated value of thermal inactivation energy (E) and constant thermal inactivation (k_d), the changes in enthalpy (ΔH^*), entropy (ΔS^*) and Gibbs free energy (ΔG^*) were calculated.

Finally, the kinetic parameters K_m and V_{max} were found equal with 0.68 mM και 4.52 mmole/mg protein/min for pNPG and 3.45 mM και 0.058 mmole/mg protein/min for cellobiose. The enzyme was strongly inhibited by glucose.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

1. Εισαγωγή

Οι γλυκοϋδρολάσες του β-D-γλυκοζιδίου (EC 3.2.1.21) ή β-γλυκοζιδάσες αποτελούν μια ομάδα καλά χαρακτηρισμένων, βιολογικά σημαντικών ενζύμων που καταλύουν τη μεταφορά μιας γλυκοζυλομάδας μεταξύ πυρηνόφιλων οξυγόνων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, μια τέτοια αντίδραση μεταφοράς γενικά οδηγεί σε υδρόλυση ενός β-γλυκοζιδικού δεσμού που συνδέει υπόλειμματα υδατανθράκων σε αρυλ-, αμινο- ή αλκυλο-β-D-γλυκοζίδια, κυανογενικά γλυκοζίδια, ολιγοσακχαρίτες βραχείας αλυσίδας και δισακχαρίτες. Κάτω από καθορισμένες συνθήκες, το αντίστροφο της υδρόλυσης, δηλαδή η σύνθεση γλυκοζιδικού δεσμού μεταξύ διαφορετικών μορίων μπορεί να συμβεί. Αυτό γίνεται μέσω δύο διαφορετικών τρόπων λειτουργίας, την αντίστροφη υδρόλυσης και της τρανσγλυκοζυλίωσης. Σε μια πρώτη προσέγγιση, η τροποποίηση των συνθηκών αντίδρασης όπως η μείωση της ενεργότητας του νερού (a_w), η δεύσμευση του προϊόντος ή η υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος οδηγεί σε μετατόπιση της ισορροπίας της αντίδρασης προς τη σύνθεση. Αυτή η αντίδραση είναι υπό θερμοδυναμικό έλεγχο. Στην τρανσγλυκοζυλίωση, ένας προσχηματισμένος γλυκοζίτης δότης (π.χ. δισακχαρίτης ή αρυλ-γλυκοζίτης) πρώτα υδρολύεται από το ένζυμο με το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου ενζύμου-γλυκοζυλίου. Αυτό στη συνέχεια παγιδεύεται από ένα πυρηνόφιλο (όπως ένας μονοσακχαρίτης, δισακχαρίτη, αρυλ-, αμινο- ή αλκυλ-αλκοόλη ή μονοτερπενική αλκοόλη) για να δώσει ένα νέο επιμηκυμένο προϊόν. Αυτή η αντίδραση είναι υπό κινητικό έλεγχο.

Το ένζυμο β-γλυκοζιδάση είναι πανταχού παρόν και εμφανίζεται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς που ξεκινώντας από τα βακτήρια μέχρι τα εξαιρετικά εξελιγμένα θηλαστικά και εκτελεί ποικίλες λειτουργίες σε αυτούς τους οργανισμούς. Στα βακτήρια και τους μύκητες, οι β-γλυκοζιδάσες είναι κυρίως ένα μέρος του ενζυμικού συστήματος κυτταρινασών και είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση ολιγοσακχαριτών βραχείας αλυσίδας και κελλοβιόζης (που προκύπτουν από το την συνεργιστική δράση των ενδογλουκανασών και κελλοβιοϋδρολασών) σε γλυκόζη σε ένα βήμα περιοριστικού ρυθμού. Η δραστηριότητα του ενζύμου μειώνεται με την αύξηση του μήκους των αλυσίδων γλυκόζης (Bisaria and Mishra, 1989, Kubicek et al., 1993). Η β-γλυκοζιδάση σε οινολογικούς ζυμομύκητες όπως ο

Debaryomyces hansenii είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση των αρωματικών ενώσεων συλλογικά αποκαλούμενες τερπενόλες (νερόλη, γερανιόλη, λιναλοόλη), βενζολ και φαινολαιθυλ αλκοόλες από τους αντίστοιχους πρόδρομους γλυκοζίτες (Rosi et al., 1994). Σε έντομα και φυτά, η β-γλυκοζιδάση εμπλέκεται στην απελευθέρωση κυανιδίων από πρόδρομους κυανο-γλυκοζίτες. Αυτό είναι μέρος ενός αμυντικού μηχανισμού που εμφανίζεται σε αυτά τα συστήματα (Esen, 1993). Επιπλέον, οι λειτουργίες της στα φυτά περιλαμβάνουν την υδρόλυση πρόδρομων φυτοορμονών, τον μεταβολισμό χρωστικών, την ανάπτυξης σπόρων και την μετατροπή βιομάζας. Στους ανθρώπους, η δεσμευμένη στη μεμβράνη β-γλυκοζιδάση του λυσοσωμικού οξέος εμπλέκεται στη νόσου του Gaucher καθώς τα κύτταρα που είναι ανεπαρκή σε αυτό το ένζυμο δεν είναι σε θέση να υδρολύσουν γλυκοζυλοκεραμίδια. Η συσσώρευση αυτών των γλυκοζυλοκεραμιδίων σε λυσοσώματα των δικτυοενδοθηλιακών κυττάρων οδηγεί σε διεύρυνση οργάνων όπως η σπλήνα, το ήπαρ και οι λεμφαδένες (Fredrickson and Sloan, 1972). Μία από τις θεραπευτικές προσεγγίσεις, είναι οι ασθενείς του Gaucher να χορηγούνται ενδοφλέβια ένεση καθαρισμένης β-γλυκοζιδάσης που λαμβάνεται από ανθρώπινο πλακούντα (Esen, 1993). Στο βαθμό που αυτά τα ένζυμα εμφανίζονται σε όλα τα βασίλεια της ζωής, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως χρήσιμοι δείκτες για τη μελέτη της εξέλιξης της εξειδίκευση των ενζύμων και τον μεταβολισμό των υδατανθράκων. Γενικά, οι β-γλυκοζιδάσες από διαφορετικές τάξεις και τα βασίλεια φαίνονται να διαφέρουν ως προς το δικό τις εξειδικεύσεις τους στο κομμάτι της αγλυκόνης (αρυλ-, αλκυλ-, ή αμινο-) που είναι συνδεδεμένο με την γλυκοζυλομάδα.

2. Ταξινόμηση των β-γλυκοζιδασών

Οι β-γλυκοζιδάσες είναι μια ετερογενής ομάδα υδρολυτικών ενζύμων και έχουν ταξινομηθεί με διάφορα κριτήρια. Δεν υπάρχει μια μοναδική σαφώς καθορισμένη μέθοδος για την ταξινόμηση των ενζύμων αυτών. Γενικά, δύο μέθοδοι για την ταξινόμησή τους εμφανίζονται στη βιβλιογραφία, σύμφωνα με (1) την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και (2) την ταυτότητα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Nucleotide Sequence Identity, NSI) (Henrissat & Bairoch, 1996).

Με βάση την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, αυτά τα ένζυμα έχουν ταξινομηθεί ως (1) αρυλ β-γλυκοζιδάσες, που δρουν σε αρυλ-γλυκοζίτες, (2) πραγματικές κελλοβιάσες, που υδρολύουν κελλοβιόζη προς απελευθέρωση γλυκόζης και (3) ένζυμα τα οποία δρουν σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων (broad substrate specificity). Οι περισσότερες από τις β-γλυκοζιδάσες που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι στιγμής ανήκουν στην τελευταία κατηγορία. Ένα από τα πρώτα συστήματα ταξινόμησης που βασίζεται στις διαθέσιμες αλληλουχίες ομαδοποίησε τα ένζυμα αυτά σε β-γλυκοζιδάσες τύπου I και τύπου II (Beguin, 1990). Ένα άλλο σύστημα προτάθηκε από τους Rojas et al. (1995) όπου οι β-γλυκοζιδάσες διαιρέθηκαν σε δύο υπο-οικογένειες, την υποοικογένεια A (BGA) και την υποοικογένεια B (BGB). Οι προηγούμενες μέθοδοι έχουν αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό από το σύστημα που προτάθηκε από τους Henrissat and Bairoch (1996) και βασίζεται στις ομοιότητες αλληλουχίας και αναδίπλωσης (ανάλυση υδροφοβικού συμπλέγματος, Hydrophobic Cluster Analysis, HCA) αυτών των ενζύμων. Η HCA έδειξε ότι οι α-έλικες και τα β-πτυχωτά φύλλα εντοπίζονται σε παρόμοιες θέσεις στην αναδιπλωμένη διαμόρφωση. Επιπλέον, ένας αριθμός διατηρημένων αμινοξέων ήταν συγκεντρωμένο κοντά στο ενεργό κέντρο. Μια τέτοια ταξινόμηση αντικατοπτρίζει τα δομικά χαρακτηριστικά, τις εξελικτικές σχέσεις και τον καταλυτικό μηχανισμό αυτών των ενζύμων. Χρειάζονται περισσότερα δεδομένα αλληλουχιών και τρισδιάστατης δομής των ενζύμων που ανήκουν σε αυτές τις οικογένειες για να επιβεβαιωθεί αυτό το σχήμα.

Το σύστημα ταξινόμησης που προτάθηκε για όλες τις γλυκοζυλ-υδρολάσες (GH), σχεδόν 2000 σε αριθμό, έχει οδηγήσει στην αναγνώριση 88 οικογενειών. Το σύστημα ονοματολογίας συνεχώς ενημερώνεται στο <http://afmb.cnrs.mrs.fr/~pedro/CAZY / dt.html> (Henrissat, 1991, Henrissat and Davies, 1997). Οι β-γλυκοζιδάσες που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία κατατάσσονται στις οικογένειες GH1, GH3, GH5, GH9 και GH30, με κυριότερες τις GH1 και GH3. Η οικογένεια GH1 περιλαμβάνει περίπου 62 β-γλυκοζιδάσες από αρχαιοβακτήρια, φυτά, θηλαστικά και περιλαμβάνει επίσης 6-φωσφογλυκοζιδάσες και θειογλυκοζιδάσες. Τα περισσότερα ένζυμα της οικογένειας GH1 εμφανίζουν και δράση β-γαλακτοζιδάσης. Η τρισδιάστατη δομή έχει ήδη αναλυθεί για πολλές β-γλυκοζιδάσες οικογένειας GH1 όπως, η κυανογονική β-γλυκοζιδάση (λιναμαράση)

από το *Trifolium repens* (Tolley et al., 1993), η BGLA από το *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa* (Sanz-Aparicio et al., 1998; Gonzalez-Blasco et al., 2000), το *Bacillus circulans*, υποείδος του *alkalophilus* (Hakulinan et al., 2000), η Cel B από το *Pyrococcus furiosus* (Kaper et al., 2000), και πιο πρόσφατα για την ZmGlu1 (Czjzek et al., 2000) και την Zm-p60.1 (Zouhar et al., 2001) από αραβόσιτο. Ένα μοντέλο για την ZmGlu1 έχει επίσης προταθεί για το σύμπλοκό του με τον αναστολέα *p*-νιτροφαινυλ-β-D-θειογλυκοζίδιο (Czjzek et al., 2001). Οι κρυσταλλικές δομές αυτών των ενζύμων έχουν βοηθήσει στην κατανόηση της ευρείας εξειδίκευσης υποστρώματος, του μηχανισμού δράσης, και τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά.

Οι β-γλυκοζιδάσες οικογένειας GH1 ταξινομούνται επίσης ως μέλη της υπερ-οικογένειας 4/7 με μια κοινό διαμόρφωση τύπου (β/α)₈-βαρέλι. Εδώ, το ενεργό κέντρο βρίσκεται σε μια βαθιά κοιλότητα που ορίζεται κατά μήκος του άξονα του βαρελιού, με ένα υποτιθέμενο καταλύτη οξέος/βάσης που βρίσκεται στο τέλος του β-κλώνου 4 και ένα καταλυτικό πυριινόφιλο κοντά στο άκρο της β-έλικας 7 (Kaper et al., 2000).

Η οικογένεια GH3 γλυκοζυλδρολασών αποτελείται από περίπου 44 β-γλυκοζιδάσες και εξωζαμινιδάσες από βακτήρια, μούχλα και ζύμη. Η τρισδιάστατη δομή έχει προσδιοριστεί μόνο για μια σχετική β-D -γλυκάνης (exo1 → 3, 1 → 4) γλουκανάση (Exo 1) από το *Hordeum vulgare*, που καταλύει την υδρόλυση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος (Varghese et al., 1999). Τα ένζυμα της οικογένειας GH3 μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε δύο τάξεις AB και AB'. Όλα τα ένζυμα αποτελούνται από δύο τομείς, A και B, όπου ο τομέας B περιέχει το υποθετικό υπόλειμμα Asp του ενεργού κέντρου στο μοτίβο SDW. Στο AB', το οποίο περιλαμβάνει την Sal B από το *Azospirillum irakense* (Faure et al., 1999) και την BgxA από το *Erwinia chrysanthemi* (Vroemen et al., 1995), ο τομέας B είναι συμπιεσμένος, αλλά συντηρημένες αλληλουχίες έχουν ακόμη διατηρηθεί. Σε μοριακό επίπεδο, τα γονίδια των GH3 β-γλυκοζιδασών αποτελούνται από πέντε διαφορετικές περιοχές, το N-τελικό υπόλειμμα, μία N-τελική καταλυτική περιοχή, μια μη-ομόλογη περιοχή, μία C-τελική περιοχή άγνωστης λειτουργίας και του C-τελικά υπόλειμματα. Πρόσφατα, χιμαιρικά ένζυμα με βελτιωμένα χαρακτηριστικά αποκτήθηκαν από την γονιδιακή μετατόπιση στην C-τελική περιοχή των γονιδίων

της β-γλυκοζιδάσης από το *Cellovibrio gilvus* και το *Agrobacterium tumefaciens* (Hayashi et al., 2001).

Λίγα είναι γνωστά για την αλληλεπίδραση των β-γλυκοζιδασών με τα υποστρώματά τους, ιδιαίτερα σε σχέση με τη μερίδα αγλυκόνης, η οποία σχηματίζεται τη βάση τεράστιας ποικιλομορφίας όσον αφορά το εύρος των υποστρωμάτων και είναι υπεύθυνη για τις λεπτές διαφορές στην εξειδίκευση στο υπόστρωμα. Η κατανόηση του μηχανισμού αναγνώρισης του υποστρώματος στην πλευρά της αγλυκόνης του υποστρώματος είναι επομένως κρίσιμη για τον σχεδιασμό ενζύμων που υδρολύουν ή συνθέτουν ενώσεις ενδιαφέροντος με επιθυμητό καταλυτική αποτελεσματικότητα για την ιατρικές και τη βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Η κρυσταλλική δομή καταλυτικώς ανενεργής β-γλυκοζιδάσης αραβοσίτου (Glu1E191D) που λαμβάνεται με 2,4-διυδροξυ-7-μεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη (DIMBOA) δίνει κάποια ένδειξη της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ένζυμου και του τμήματος αγλυκόνης (Czjzek et al., 2000). Τα δομικά στοιχεία του συγκροτήματος, που επιλύθηκε σε 2,0-Å, έδειξε ότι η μονάδα αγλυκόνης του υποστρώματος ήταν ανάμεσα σε Trp378 στη μια πλευρά και σε Phe198, Phe205, και Phe466 από την άλλη (Czjzek et al., 2001). Επιπλέον αυτών, το Ala467 αλληλεπιδρά με το 7-μεθόξυ τμήμα του DIMBOA. Έτσι, ειδικές διαμορφώσεις των υδρόφοβων αμινοξέων και το σχήμα που σχηματίζεται μέσα σε αυτά καθορίζει την αναγνώριση της αγλυκόνης και την εξειδίκευση του υποστρώματος σε ένζυμο Glu1. Όλα τα υπόλειμματα εκτός από το Trp378 βρέθηκαν να ποικίλουν μεταξύ των β-γλυκοζιδασών που διαφέρουν στην εξειδίκευση στο υπόστρωμα, υποστηρίζοντας ένα σημαντικό ρόλο αυτών των τεσσάρων υδρόφοβων αμινοξέων.

2.1 Εντοπισμός των β-γλυκοζιδασών

Οι μικροβιακές β-γλυκοζιδάσες εντοπίζονται ενδοκυτταρικά, εξωκυτταρικά ή μπορεί να είναι καθηλωμένες στη μεμβράνη (Günata and Vallier, 1999, Raza et al., 2011). Γενικά οι β-γλυκοζιδάσες που ανήκουν στην οικογένεια GH3 εντοπίζονται ως εξωκυτταρικά ή καθηλωμένες στη μεμβράνη ενώ αυτές που ανήκουν στην οικογένεια GH1 είναι κυρίως ενδοκυτταρικά ένζυμα (Nijikken et al., 2007, Zhou et al., 2012). Ορισμένα είδη μυκήτων όπως ο *Trichoderma reesei* είναι γνωστό ότι συνθέτουν εξωκυτταρική, ενδοκυτταρική και καθηλωμένη στη μεμβράνη β-γλυκοζιδάση

(Saloheimo et al., 2002). Η πλειοψηφία των μυκητιακών β-γλυκοζιδασών είναι εξωκυτταρικές και ανήκουν στην GH3 ενώ η πλειονότητα των βακτηριακών β-γλυκοζιδασών είναι ενδοκυτταρικές και ανήκουν στην GH1 (Bhatia et al., 2002). Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί μία εξωκυτταρική και μία καθηλωμένη στη μεμβράνη β-γλυκοζιδάση από *Aspergillus kawachii* (Iwashita et al., 1999), μια ενδοκυτταρική β-γλυκοζιδάση από το βακτήριο *B. circulans* υποείδος του *Alkalophilus* (Paavilainen et al., 1993) και η εξωκυτταρική β-γλυκοζιδάση από το βακτήριο *Bacillus subtilis* (Agrawal et al., 1994). Επίσης έχει απομονωθεί εξωκυτταρική, ενδοκυτταρική και προσκολλημένη στη μεμβράνη β-γλυκοζιδάση από ζύμη (Saha and Bothast, 1996, Rosi et al., 1994, Hernández et al., 2003).

2.2 Δομές β-γλυκοζιδάσης

Οι β-γλυκοζιδάσες έχουν διάφορες δομές, αλλά η συνολική αναδίπλωση του καταλυτικού τομέα είναι παρόμοια σε κάθε οικογένεια GH. Οι οικογένειες GH1, GH5 και GH30 ανήκουν στην φατριά GH-A, και έχουν παρόμοιες δομές τύπου (β/α)₈-βαρέλι που περιέχουν το ενεργό κέντρο τους. Αντίθετα, τα ένζυμα GH3 έχουν δύο τομείς που συμβάλλουν στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου τους. Ένζυμα της GH9 έχουν δομές τύπου (α/α)₆-βαρέλι, ενώ η οικογένεια GBA2 δείχνει μικρή ομολογία με τις πρωτεΐνες με τη δομή (α/α)₆ (Σχήμα 2).

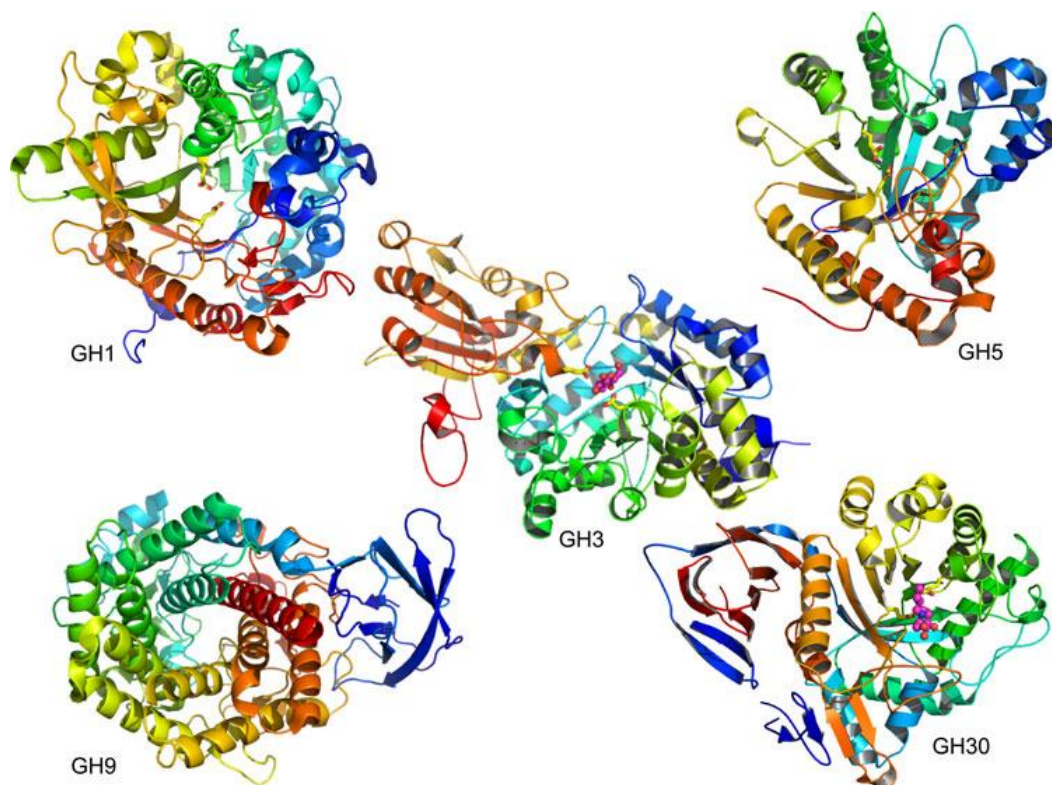
Τα ένζυμα GH-A των οικογενειών GH1, GH5 και GH30 όλα έχουν μια κοινή δομή τύπου (β/α)₈-βαρέλι και τα ενεργά τους κέντρα περιέχουν δύο διατηρημένα υπόλειμματα καρβοξυλικού οξέος στα β-πτυχωτά φύλλα 4 και 7, που λειτουργούν ως καταλυτικό οξύ / βάση και πυρηνόφιλο, αντίστοιχα. Τα μήκη και οι μάζες των υπομονάδων των ενζύμων της GH1 ποικίλλουν σημαντικά, ανάλογα με την παρουσία βοηθητικών τομέων και εφεδρικών GH1 περιοχών (όπως στην ανθρώπινη LPH), αλλά η καταλυτική περιοχή κυμαίνεται από περίπου 440 έως 550 υπολείμματα, ανάλογα με τα μήκη των θηλειών και τα C-τελικά άκρα των β-πτυχωτών φύλλων του (β/α)₈-βαρελίου. Αυτά τα μονομερή σχηματίζουν ένα ευρύ φάσμα τεταρτοταγών δομών, συμπεριλαμβανομένων μονομερών ενζύμων, διμερών, τετραμερών, εξαμερών, οκταμερών και μεγάλων συσσωματωμάτων.

Οι β-γλυκοζιδάσες της οικογένειας GH3 και οι εξωγλουκανάσες έχουν δομή δύο τομέων, μία δομή (β/α)₈-βαρελίου ακολουθούμενη από ένα α/β σάντουιτς που

περιλαμβάνει 6 κλώνους β-πτυχωτών φύλλων μεταξύ τριών α-ελίκων εκατέρωθεν. Το ενεργό κέντρο των ενζύμων της GH3 βρίσκεται μεταξύ των $(\beta/\alpha)_8$ και $(\alpha/\beta)_6$ περιοχών, καθεμιά από τις οποίες συνεισφέρει ένα καταλυτικό καρβοξυλικό υπόλειμμα (Σχήμα 2). Το καταλυτικό πυρηνόφιλο για την Exo I του κριθαριού είναι ένα ασπαρτικό οξύ στη θέση D285 ενώ το καταλυτικό οξύ / βάση είναι το γλουταμικό στη θέση E491.

Μόνο μερικές πρωτεΐνες GH9 έχουν επιβεβαιωθεί ότι είναι β-γλυκοζιδάσες, καθώς οι περισσότερες πρωτεΐνες στην οικογένεια αυτή είναι ενδο-γλυκοζιδάσες. Αυτή η οικογένεια αποτελείται από $(\alpha/\alpha)_6$ βαρέλια. Πρόσφατα, προσδιορίστηκε η δομή μιας πρωτεΐνης από το *Vibrio parahaemolyticus* με ομολογία 69% με τη β-γλυκοζιδάση του *Vibrio cholera* (PDB καταχώρηση 3H7L, Σχήμα 2). Τα ένζυμα της οικογένειας GH9 είναι οι πρώτες β-γλυκοζιδάσες που βρέθηκε να δρουν μέσω ενός μηχανισμού αναστροφής (ο μηχανισμός που επικρατεί στην οικογένεια GH9), το οποίο είναι ασυνήθιστο, αφού όλες οι άλλες β-γλυκοζιδάσες που περιγράφονται μέχρι στιγμής δρουν μέσω ενός συντηρητικού μηχανισμού.

Η ανθρώπινης προέλευσης GBA2 και οι συγγενικές της δεν σχετίζονται με άλλες β-γλυκοζιδάσες, αλλά παρουσιάζουν μικρές ομοιότητες με ορισμένα $(\alpha/\alpha)_6$. Η ακολουθία της GBA2 δεν περιέχει καμία ακολουθία σήματος έκκρισης και μία μόνο υποθετική διαμεμβρανική περιοχή, αλλά προβλεπόταν να έχει το N-άκρο της στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο C-τελικό άκρο στο κυτταρόπλασμα. Η θέση αυτής της υποτιθέμενης διαμεμβρανικής α-έλικας βρίσκεται στη μέση μιας ακολουθίας η οποία είναι ομόλογη με τη διαλυτή $(\alpha/\alpha)_6$ αμυλοϋδρολάση, τη χιτοβιόζη, τη φωσφορυλάση και την α-L-ραμνοσιδάση (EC 3.2.1.40) και η χαμηλή εμπιστοσύνη στην πρόβλεψη της διαμεμβρανικής τοπολογίας θέτει υπό αμφισβήτηση αυτή την τοπολογία, αλλά το ένζυμο συνδέεται σαφώς με μεμβράνες με κάποιο τρόπο.

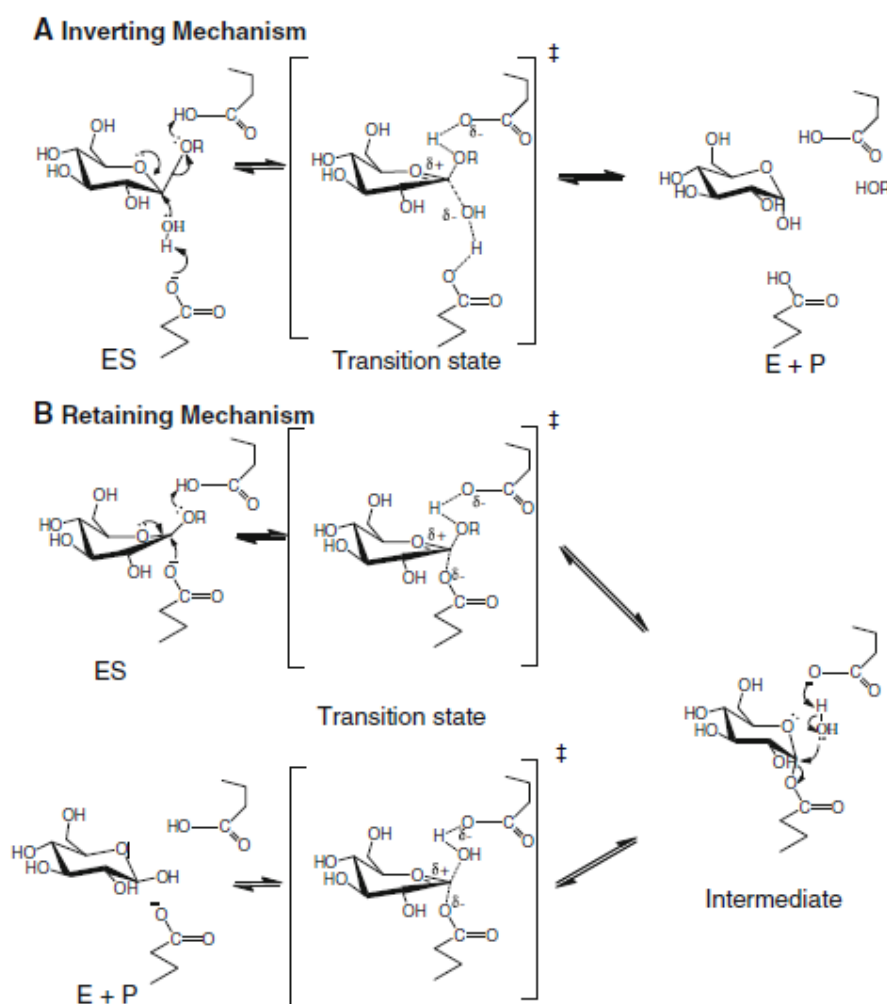


Εικόνα 1: Δομές β-γλυκοζιδασών από διαφορετικές οικογένειες GH. Αυτές περιλαμβάνουν β-γλυκοζιδάσες ή συναφή ένζυμα από την GH1 (*Zea Mays* ZmGlu1, κωδικός PDB 1E1E), την GH3 (*Hordeum vulgare* Exo I γλυκοϋδρολάση β-γλυκάνης, κωδικός PDB 1EX1), GH5 (*Candida albicans* Exg εξωκλουκανάση exo-β-(1,3)-γλουκανάσης, κωδικός PDB 1CZ1), GH30 (*Homo sapiens*, όξινη β-γλυκοζιδάση / γλυκοερεβροσιδάση GBA1, PDB κωδικός 2V3D) και GH9 (*V. parahaemolyticus*, υποτιθέμενη εξωγλυκανάση, κωδικός PDB 3H7L). Οι δομές είναι χρωματισμένες με ένα φάσμα χρωμάτων από μπλε σε κόκκινο από τα N στα C-τελικά άκρα, με το καταλυτικά πυρηνόφιλα υπολείμματα και τα υπολείμματα οξέος-βάσης να παρουσιάζονται με μορφή sticks για εκείνα τα ένζυμα στα οποία είναι γνωστά. Οι συνδέτες που φαίνονται είναι γλυκόζη στην GH3 ExoI κριθαριού και N-βουτυλο-δεσοξυνογλυκιμυκίνη στην GH30 ανθρώπινη GBA1, αμφότερα φαίνονται με άνθρακες σε ροζ χρώμα. Η ανθρώπινη GBA2 (β-γλυκοζιδάση χολικού οξέος) παρουσιάζει μικρή ομοιότητα αλληλουχίας με τα (α/α)₆ ένζυμα, υποδηλώνοντας ότι η καταλυτική του περιοχή μπορεί να είναι παρόμοια με τη δομή των GH9. Σχεδιάστηκε με PyMol (DeLano)

3. Καταλυτικός μηχανισμός της β-γλυκοζιδάσης

Οι γλυκοζιδικές υδρολάσες πραγματοποιούν την κατάλυση μέσω δύο μηχανισμών (α) με αναστροφή και (β) με διατήρηση της χειρομορφίας του ανωμερικού άνθρακα. Και στους δύο μηχανισμούς υπάρχει ένα ζεύγος όξινων και πυρηνόφιλων κατάλοιπων, συνήθως καρβοξυλικά οξέα, σε κάθε πλευρά του σακχάρου, σε απόσταση περίπου 5 Å στο μηχανισμό διατήρησης, και 10 Å στον μηχανισμό αναστροφής, όπου ένα μόριο νερού πρέπει να ταιριάζει μεταξύ της καταλυτικής βάσης και του υποστρώματος. Οι β-γλυκοζιδάσες της GH9 χρησιμοποιούν έναν μηχανισμό αναστροφής, στον οποίο ένα ενεργοποιημένο μόριο νερού κάνει μια άμεση πυρηνόφιλη προσβολή στον ανωμερικό άνθρακα για να μετατοπίσει το

άγλυκο τμήμα του υποστρώματος σε ένα μόνο βήμα, όπως φαίνεται στο σχήμα 5α. Η καταλυτική βάση απομακρύνει ένα πρωτόνιο από το εισερχόμενο μόριο νερού ενώ το καταλυτικό οξύ πρωτονιώνει την αποχωρούσα ομάδα αγλυκόνης. Αντίθετα, οι περισσότερες β-γλυκοζιδάσες που έχουν χαρακτηριστεί (δηλ. ένζυμα των οικογενειών GH1, GH3 και GH30) είναι ένζυμα διατήρησης και πραγματοποιούν την κατάλυση σε δύο στάδια, γλυκοζυλίωση και απογλυκοζυλίωση (Σχήμα 5β). Στη γλυκοζυλίωση, η αγλυκόνη απομακρύνεται με τη λήψη ενός πρωτονίου από το καταλυτικό οξύ/βάση και η πυρηνόφιλη προσβολή του πυρηνόφιλου στον ανωμερικό άνθρακα οδηγεί σε ένα ενδιάμεσο ενζύμου-γλυκόνης. Στο στάδιο της απογλυκοζυλίωσης, η διαδικασία αντιστρέφεται, καθώς το μόριο του νερού προσβάλλει με τη βοήθεια της βάσης από το καταλυτικό οξύ/βάση προκειμένου να εκτοπίσει το καταλυτικό πυρηνόφιλο από τη γλυκόζη (Cairns and Esen, 2010).



Εικόνα 2: Καταλυτικοί μηχανισμοί β-γλυκοσιδασών: Α) Ο μηχανισμός αναστροφής και Β) μηχανισμός υδρόλυσης με διατήρηση της ανωμερικής διαμόρφωσης

4. Παραγωγή μικροβιακής β-γλυκοζιδάσης

Γενικά οι μικροοργανισμοί παράγουν χαμηλή ποσότητα β-γλυκοζιδάσης, π.χ., είδη υπερπαραγωγών κυτταρινασών, όπως το *T. reesei*, στερούνται επαρκούς ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης (Martinez et al., Stutzenberger et al.). Οι β-γλυκοζιδάσες έχουν παραχθεί από έναν αριθμό μυκήτων, ζυμομυκήτων και βακτηρίων είτε με ζύμωση στερεάς κατάστασης (Solid State Fermentation, SSF), είτε σε βυθισμένη ζύμωση (Submerged Fermentation, SMF) (Raza et al., 2012, Baraldo et al., 2014, Pandey et al., 1999). Στην SSF, ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε στερεό υπόστρωμα όπως π.χ. βγάση από ζαχαροκάλαμο, κέικ κασάβας, πίτυρο σιταριού, άχυρο ρυζιού, φλοιό αραβοσίτου ή μίγματα των παραπάνω. Στα πλεονεκτήματα της SSF περιλαμβάνονται (Coradi et al., 2012, Brijwani et al., 2011, Kovacs et al., 2008):

- ✓ μεγαλύτερες ή και ίσες αποδόσεις έναντι αυτών της βυθισμένης ζύμωσης
- ✓ η χαμηλή συγκέντρωση ύδατος στην ζύμωση στερεάς κατάστασης οδηγεί στη διατήρηση των ασηπτικών συνθηκών
- ✓ οι συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας και pH παρουσιάζουν έντονες ομοιότητες με τις φυσικές συνθήκες ανάπτυξης των περισσότερων μυκήτων υψηλότερα επίπεδα αερισμού, ειδικά στις διεργασίες που απαιτούν έντονο οξειδωτικό μεταβολισμό
- ✓ ο εμβολιασμός με σπόρια ευνοεί την διασπορά των κυττάρων στο μέσο ανάπτυξης
- ✓ το μέσο της καλλιέργειας είναι συνήθως πολύ απλό
- ✓ απλός σχεδιασμός αντιδραστήρων
- ✓ χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις
- ✓ μικρός όγκος απόβλητων
- ✓ η χαμηλή υγρασία του θρεπτικού μέσου ευνοεί την παραγωγή προϊόντων που δεν μπορούν να παραχθούν σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας
- ✓ σε ορισμένες περιπτώσεις τα λαμβανόμενα προϊόντα διαφέρουν στις ιδιότητες από αυτά της βυθισμένης καλλιέργειας
- ✓ μικρότεροι όγκοι αντιδραστήρων

Η ζύμωση στερεάς κατάστασης παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα όπως (Coradi et al., 2012, Brijwani et al., 2011, Kovács et al., 2008):

- ✓ μπορούν να χρησιμοποιηθούν μονό μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε χαμηλό περιεχόμενο υγρασίας
- ✓ τις περισσότερες φορές τα υποστρώματα απαιτούν προκατεργασία
- ✓ ο προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης είναι δύσκολος
- ✓ η στερεά φύση των υποστρωμάτων δημιουργεί προβλήματα στον έλεγχο παραμέτρων της διεργασίας (pH, περιεχόμενη υγρασία, συγκέντρωση οξυγόνου και βιομάζας)
- ✓ η ανάδευση είναι δύσκολη, συνεπώς προτιμώνται στατικές συνθήκες
- ✓ συχνά απαιτούνται μεγάλοι όγκοι εμβολίου
- ✓ οι πληροφορίες αναφορικά με το σχεδιασμό και τη λειτουργία αντιδραστήρων μεγάλης κλίμακας είναι λιγοστές
- ✓ πιθανότητα μόλυνσης από άλλους μύκητες
- ✓ η απομάκρυνση της θερμότητας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είναι δύσκολη
- ✓ τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται από τα ζυμωμένα στερεά έχουν συνήθως υψηλό ιξώδες
- ✓ η μεταφορά μάζας περιορίζεται από τη διάχυση
- ✓ σε ορισμένες ζύμωση στερεάς κατάστασης ο αερισμός είναι δύσκολος λόγω υψηλής συγκέντρωσης υποστρώματος
- ✓ τα σπόρια παρουσιάζουν μεγαλύτερη λανθάνουσα φάση λόγω της απαίτησης για βλάστηση
- ✓ οι χρόνοι καλλιέργειας είναι μεγαλύτεροι από αυτούς της βυθιζόμενης ζύμωσης

Σε SMF, χρησιμοποιείται υγρό ελεύθερης ροής όπως μελάσα και ζωμοί που περιέχουν διαφορετικές θρεπτικές ουσίες για την καλλιέργεια μικροοργανισμών. Οι βιοδραστικές ουσίες, τα ένζυμα και τα μεταβολικά απόβλητα εκκρίνονται στο μέσο ζύμωσης και τα υποστρώματα χρησιμοποιούνται γρήγορα, συνεπώς απαιτείται συνεχής συμπλήρωση με θρεπτικά συστατικά. Αυτή η τεχνική ζύμωσης είναι ιδανική για μικροοργανισμούς που απαιτούν υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, όπως βακτήρια. Τα βασικά πλεονεκτήματα της SMF είναι η ευκολία στη διατήρηση

στείρων συνθηκών, στη μεταφορά θερμότητας και μάζας, στην παρακολούθηση και αυτοματοποίηση της διαδικασίας, καθώς και της ανάκτησης ενζύμων και βιοδραστικών ουσιών (Singhania et al., 2013, Brijwani et al., 2011, Hölker et al., 1996, Vintegra- González et al., 2003, Subramaniyam et al., 2012, Acuña-Argüelles et al., 1995, Zhang et al., 2011). Υπάρχουν αρκετές αναφορές για την παραγωγή β-γλυκοζιδάσης από νηματώδεις μύκητες και ζύμη με SSF και SMF. Ο Πίνακας 1 συνοψίζει τις μεθόδους παραγωγής από διάφορες μικροβιακές πηγές (Ahmed et al., 2017).

Πίνακας 1. Μέθοδοι παραγωγής β-γλυκοζιδάσης από φιάφορα είδη μυκήτων και ζυμών

Μύκητες	Μέθοδος ζύμωσης
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> Syzx4	SMF
<i>Penicillium simplicissimum</i> H-11	SMF
<i>Aspergillus strain</i> SA 58	SSF
<i>Penicillium citrinum</i> YS40-5	SSF
<i>Fusarium proliferatum</i>	SMF
<i>Fusarium solani</i>	SSF
<i>Aspergillus niger</i> + <i>A. Oryzae</i>	SSF
<i>Fomitopsis palustris</i>	SMF
<i>Aspergillus niger</i> SOI017	SMF
<i>Flammulina velutipes</i>	SMF
<i>Monascus sanguineus</i>	SSF
<i>Phoma sp.</i> KCTC11825BP	SMF
<i>Aspergillus niger</i> AS 3.4309	SSF
<i>Aspergillus terreus</i> EMOO 6-4	SSF
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	SSF
<i>Aspergillus niger</i> HDF05	SSF
<i>Gongronella butleri</i>	SSF
<i>Penicillium miczynskii</i>	SMF
<i>Fusarium oxysporum</i>	SMF
Ζύμες	

<i>Aureobasidium pullulans</i>	SMF
<i>Candida peltata</i>	SMF
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	SMF
<i>Aureobasidium sp.</i>	SSF+SMF
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SMF

4.1 Παράμετροι Παραγωγής

Η βελτιστοποίηση των συνθηκών ζύμωσης είναι πολύ σημαντικό βήμα για την υψηλή παραγωγή και εμπορία ενζύμων. Υπάρχουν πολλές παράμετροι που πρέπει να βελτιστοποιηθούν κατά την παραγωγή ενζύμων, όπως η πηγή άνθρακα και η συγκέντρωση αυτής, η πηγή αζώτου και η συγκέντρωση αυτού, τα άλατα, το pH, η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα οξυγόνου, ο χρόνος ζύμωσης, το μέγεθος εμβολίου κλπ. Οι βέλτιστες συνθήκες ζύμωσης ποικίλουν ανάλογα με τα μικροβιακά είδη, το απαιτούμενο τελικό προϊόν και τις μεθόδους παραγωγής.

4.1.1 Πηγή άνθρακα

Η παραγωγή της β-γλυκοσιδάσης επάγεται από τις πηγές άνθρακα που περιέχονται στο μέσο ζύμωσης. Τέτοιες πηγές άνθρακα μπορεί να είναι πολύπλοκοι υδατάνθρακες όπως η κυτταρίνη, το πίτουρο σίτου, το άχυρο ρυζιού, ο φλοιός ρυζιού, η βαγάση ζαχαροκάλαμου και η πηκτίνη ή απλά σάκχαρα όπως γλυκόζη, λακτόζη, κελλοβιόζη ή σοφορόζη. Το σύνθετο σάκχαρο δεν μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, επομένως πιστεύεται ότι ορισμένα εκφρασμένα ένζυμα το αποικοδομούν σε απλά σάκχαρα όπως κελλοβιόζη, λακτόζη κλπ. τα οποία στη συνέχεια μπορούν να μεταφερθούν μέσω της κυτταρικής μεμβράνης με τη βοήθεια ειδικών μεταφορέων στο κυτταρόπλασμα, όπου διεγείρουν την έκφραση αυτών των ενζύμων με μηχανισμό που δεν έχει αποσαφηνιστεί. Η σύνθεση της β-γλυκοζιδάσης και των άλλων κυτταρινολυτικών ενζύμων καταστέλλεται από σάκχαρα, όπως η γλυκόζη, σε ένα φαινόμενο που είναι γνωστό ως καταβολική καταστολή. Η βέλτιστη πηγή άνθρακα για την παραγωγή β-γλυκοζιδάσης ποικίλει ανάλογα με τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της, τη μέθοδο ζύμωσης και άλλες παραμέτρους ζύμωσης (θερμοκρασία, pH, πηγή αζώτου, χρόνος επώασης κλπ.) καθώς και τις

αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραπάνω παραγόντων. Για παράδειγμα, η μέγιστη παραγωγή εξωκυτταρικής και ενδοκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης από το μύκητα *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* επιτεύχθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές άνθρακα βαγάση ζαχαροκάλαμου και avicel, αντίστοιχα (Venturi et al., 2002). Ο μύκητας *Aspergillus oryzae* παράγει υψηλές ενεργότητες β-γλυκοζιδάσης με υψηλή ανοχή στη γλυκόζη (HGT-BGL) όταν ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η κερκετίνη (Riou et al., 1998). Σε ζύμωση στερεάς κατάστασης, το στέλεχος SA 58 του γένους *Aspergillus* παρήγαγε δύο εξωκυτταρικές β-γλυκοζιδάσες με πηκτίνη ως πηγή άνθρακα (Ng et al., 2010). Ο μικροβιακός συνεργισμός συνεπάγεται δύο ή περισσότερες μικροβιακές ομάδες. Η βέλτιστη παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης από το μικροβιακό συνεργισμό των *A. niger* και *A. oryzae* επιτεύχθηκε όταν το πίτυρο σίτου χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα (Vaithanomsat et al., 2011). Παρομοίως, επιτεύχθηκε βέλτιστη παραγωγή β-γλυκοζιδάσης από το *Fusarium proliferatum* NBRC109045 όταν καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό που περιείχε σπόρους καλαμποκιού και πίτυρο σίτου (Gao et al., 2012). Ο μύκητας *Aspergillus saccharolyticus* παρήγαγε μέγιστη ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης όταν καλλιεργήθηκε σε μέσο που περιείχε ξυλόζη, ξυλόνη, πίτυρα σίτου και προ-επεξεργασμένο σπόρο καλαμποκιού (Sørensen et al., 2014). Η μέγιστη παραγωγή β-γλυκοζιδάσης από τους μύκητες *Flammulina velutipes* και *Penicillium purpurogenum* επιτεύχθηκε όταν αναπτύχθηκαν σε μέσο που περιέχει σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα (Dhake and Patil, 2005, Jeya and Lee, 2013). Η βέλτιστη παραγωγή β-γλυκοσιδάσης από τον *Monascus sanguineus* ελήφθη όταν εξετάστηκαν σπόροι τζακφρουτ ως πηγή άνθρακα μεταξύ πίτυρου σίτου, υπολειμμάτων καρύδας και σπόρων ταμαρίνδου (Dikshit et al., 2015). Το *Stereum hirsutum* παρήγαγε βέλτιστη β-γλυκοζιδάση όταν αναπτύχθηκε σε avicel και παρατηρήθηκε ελάχιστη παραγωγή σε μέσο που περιείχε γλυκόζη (Garcia et al., 2015). Η μέγιστη ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης βρέθηκε όταν ο μικροοργανισμός *Lichtheimia ramosa* καλλιεργήθηκε σε πίτυρο σίτου ως πηγή άνθρακα υπό SSF (Abdella et al., 2016). Ο μύκητας *A. niger* NRRL 3112 παρήγαγε μέγιστη ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης όταν χρησιμοποιήθηκε πίτυρο σίτου και γλυκερόλη ταυτόχρονα (Mahapatra et al., 2016). Πιο ενδιαφέρον είναι ότι επιτεύχθηκε βέλτιστη παραγωγή εξωκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης από το *Candida pelata* όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη και ξυλόζη και τα

οποία θεωρούνται απλά μεταβολιζόμενα σάκχαρα και καταβολιτικοί καταστολείς (Saha and Bothast, 1996). Ο μικροοργανισμός *Kluyveromyces marxianus* παρήγαγε υψηλή ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης όταν καλλιεργήθηκε σε μέσο που περιείχε κελλοβιόζη, σακχαρόζη και λακτόζη (Iembo et al., 2002) και το *Aureobasidium pullulans* παρήγαγε το υψηλότερο επίπεδο εξωκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης όταν καλλιεργήθηκε σε μέσο που περιείχε λακτόζη και πίτυρο καλαμποκιού (Rajoka et al., 2004). Η βέλτιστη παραγωγή εξωκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Proteus mirabilis* VIT117 επιτεύχθηκε σε μέσο με σορβιτόλη ως πηγή άνθρακα (Singhanian et al., 2011).

Πολλοί νηματοειδείς μύκητες έχουν αποδειχθεί ότι εκφράζουν πολλαπλά ισόμορφα β-γλυκοζιδασών όταν καλλιεργούνται σε διαφορετική πηγή άνθρακα (Sonia et al., 2008, Riou et al., 1998). Για παράδειγμα, ο μύκητας *A. niger* NII-08121 / MTCC 7956 εξέφρασε τέσσερα ισόμορφα της β-γλυκοζιδάσης όταν καλλιεργήθηκε σε λακτόζη ή κυτταρίνη ως πηγή άνθρακα ενώ μόνο δύο ισόμορφα βρέθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε πίτυρο σίτου ή άχυρο ρυζιού ως πηγή άνθρακα (Singhanian et al., 2011). Ομοίως, ο μύκητας *Penicillium funiculosum* NCL1 εκφράζει τέσσερα ισόμορφα σε πίτυρο σίτου, δύο ισόμορφα σε βαγάση ζαχαροκάλαμου, ένα ισόμορφο σε μέσο που περιέχει anicel σε SMF, ενώ δεν παράγεται ισόμορφο σε σαλικίνη (Ramani et al., 2012). Αυτά τα ισόμορφα μπορεί να προκύψουν από την παρουσία πολλαπλών γονιδίων, τη διαφορική διάσπαση mRNA και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η γλυκοζυλίωση και η πρωτεόλυση (Singhanian et al., 2012, Collins et al., 2005). Ο ρυθμιστικός μηχανισμός που διέπει τη δημιουργία αυτών των ισόμορφων δεν είναι σαφής.

4.1.2 Πηγή αζώτου

Για να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί, πρέπει να συμπεριληφθεί στο μέσο ζύμωσης μια πηγή αζώτου απαραίτητη για τη σύνθεση αμινοξέων, πρωτεϊνών, αζωτούχων ενώσεων, βιταμινών, νουκλεϊνικών οξέων και βιοδραστικών ουσιών (Sundarram et al., 2014, Kun et al., 2003). Η πηγή αζώτου μπορεί να είναι οργανική ή ανόργανη. Οργανικές πηγές αζώτου μπορούν να είναι πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, εκχύλισμα βοδινού, τρυπτόνη ή αλεύρι σόγιας. Ανόργανη πηγή αζώτου μπορεί να είναι το θειικό αμμώνιο, το χλωριούχο αμμώνιο, το όξινο φωσφορικό αμμώνιο κλπ.

Για τη βέλτιστη παραγωγή β-γλυκοζιδάσης, διαφορετικά είδη απαιτούν διαφορετική πηγή αζώτου. Η μέγιστη παραγωγή β-γλυκοζιδάσης από το *Penicillium simplicissimum* H-11 επιτεύχθηκε σε μέσο που περιείχε σκόνη κέικ φασολιών ως πηγή αζώτου (Pandey et al., 1999). Το *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* παρήγαγε υψηλή ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης όταν αναπτύχθηκε σε πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης ως πηγή αζώτου (Venturi et al., 2002). Το στέλεχος SA 58 του γένους *Aspergillus* παρήγαγε υψηλό επίπεδο εξωκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης όταν καλλιεργήθηκε σε μέσο που περιείχε εκχύλισμα βοδινού ως πηγή αζώτου ενώ παρατηρήθηκε ελάχιστη παραγωγή όταν χρησιμοποιήθηκαν άλατα αμμωνίου ως πηγή αζώτου (Ng et al., 2010). Ο μικροοργανισμός *Flammulina velutipes* παρήγαγε την υψηλότερη ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης όταν η L-ασπαράγινη χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου σε σύγκριση με τα άλατα αμμωνίου (Jeya et al., 2010) ενώ το *Penicillium citrinum* YS40-5 βρέθηκε ότι παράγει το υψηλότερο επίπεδο εξωκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης όταν καλλιεργείται σε μέσο που περιέχει ουρία ως πηγή αζώτου υπό SSF (Ng et al., 2010). Ο μικροοργανισμός *P. purpurogenum* βρέθηκε ότι παράγει υψηλό επίπεδο ενδοκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης όταν αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει NaNO_3 ως πηγή αζώτου μεταξύ των τριών αλάτων NaNO_3 , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ που εξετάστηκαν (Dhake and Patil, 2005). Ο μικροοργανισμός *S. hirsutum* παρήγαγε υψηλή ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης όταν χρησιμοποιήθηκε η τρυπτόνη ως πηγή αζώτου (Garcia et al., 2015). Ο μικροοργανισμός *Kluyveromyces marxianus* παρήγαγε υψηλή ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης όταν χρησιμοποιήθηκε υγρό απόρριψης αραβοσίτου ως πηγή αζώτου (corn steep liquor) (Iembo et al., 2002). Ο μύκητας *Aspergillus protuberus* παρήγαγε υψηλή ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης όταν χρησιμοποιήθηκε θειικό αμμώνιο ως πηγή αζώτου υπό SSF (Yadav et al., 2016).

4.1.3 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία της παραγωγής β-γλυκοζιδάσης ποικίλλει από είδος σε είδος. Συνήθως η θερμοκρασία παραγωγής της β-γλυκοζιδάσης συμπίπτει με τη βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Για παράδειγμα, η β-γλυκοζιδάση έχει παραχθεί από *Monascus purpureus* στους 30 °C (Daroit et al., 2008), από *Penicillium italicum* στους 28 °C (Park et al., 2012), από *Chaetomium*

thermophilum var. *Coprophilum* στους 45 °C (Venturi et al., 2002), από *Penicillium simplicissimum* H-11 στους 30 °C (Pandey et al., 1999), από *Daldinia eschscholzii* στους 25 °C (Karnchanatat et al., 2007), από *Thermoascus aurantiacus* στους 50 °C (Parry et al., 2001) και από *Aspergillus oryzae* στους 28 °C (Riou et al., 1998). Το στέλεχος SA 58 του γένους *Aspergillus* βρέθηκε ότι παράγει μέγιστη β-γλυκοζιδάση σε θερμοκρασία 35 °C, αν και ο οργανισμός αναπτύσσεται βέλτιστα στους 30 °C. Θερμοκρασία ίση με 32 °C ήταν βέλτιστη για την παραγωγή β-γλυκοζιδάσης από *P. purpurogenum* KJS506 ο οποίος αναπτύσσεται βέλτιστα στους 28 °C (Jeya et al., 2010). Η βέλτιστη παραγωγή β-γλυκοζιδάσης από *L. ramosa* και *A. Protuberus* παρατηρήθηκε στους 35 και 30 °C αντίστοιχα (Abdella et al., 2016, Yadav et al., 2016). β-γλυκοζιδάση έχει παραχθεί από βακτηριακά είδη: το *Clostridium thermocellum* στους 60 °C (Ait et al., 1982), το αρχαιοβακτήριο *P. furiosus* στους 90 °C (Kengen et al., 1993), το *Lactobacillus brevis* στους 25 °C (Michlmayr et al., 2010), το *flavobacterium Johnsonae* στους 28 °C (Okamoto et al., 2000), το ψυχρόφιλο *Shewanella* sp. G5 στους 15 °C (Cristóbal et al., 2009). Αυτές οι θερμοκρασίες είναι ακριβώς ίδιες για την ανάπτυξη των ειδών.

4.1.4 pH

Τα διαφορετικά είδη απαιτούν διαφορετικό αρχικό pH για βέλτιστη παραγωγή β-γλυκοζιδάσης. Για παράδειγμα, η β-γλυκοζιδάση έχει παραχθεί από το *Fusarium oxysporum* σε pH 6.0 (Christakopoulos et al., 1994), το *Penicillium italicum* σε pH 4.5 (Park et al., 2012), το *Aspergillus oryzae* σε pH 6.0 (Riou et al., 1998), το *Fusarium proliferatum* NBRC109045 σε pH 5.0 (Gao et al., 2012), το *Candida peltata* pH 5.0 (Rajoka et al., 2004), *Daldinia eschscholzii* σε pH 5.5 (Karnchanatat et al., 2007) και το *Phoma* sp. KCTC11825BP σε pH 4.5 (Choi et al., 2011). Το στέλεχος SA 58 του γένους *Aspergillus* βρέθηκε ότι παράγει βέλτιστη β-γλυκοζιδάση σε pH 5.0 (Ng et al., 2010). Η βέλτιστη παραγωγή β-γλυκοζιδάσης από *Pichia pastoris* επιτεύχθηκε σε pH 7.5 (Batra et al., 2014). Ο μικροβιακός συνεργισμός των *A. niger* και *A. oryzae* βρέθηκε ότι παράγει βέλτιστη β-γλυκοζιδάση σε pH 5.5 (Raza et al., 2011).

4.1.5 Χρόνος επώασης / περιόδος ζύμωσης

Η περίοδος ζύμωσης είναι μια άλλη κρίσιμη παράμετρος που επηρεάζει την παραγωγή ενζύμων. Συνήθως η παραγωγή ενζύμου αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου επώασης μέχρις ότου φθάσει σε μια μέγιστη τιμή πέρα από την οποία υπάρχει μείωση της παραγωγής και της ενεργότητας των ενζύμων. Η μείωση της παραγωγής ενζύμων μπορεί να αποδοθεί στη μείωση της διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών, στη συσσώρευση και /ή στην τοξικότητα παραχθέντων προϊόντων και στη μείωση της σταθερότητας του ίδιου του ενζύμου. Βέλτιστη παραγωγή β-γλυκοζιδάσης από *A. niger* και *Trichoderma* sp. επιτεύχθηκε μετά από 4 και 5 ημέρες ζύμωσης, αντίστοιχα, μετά τις οποίες η παραγωγή μειώθηκε σταδιακά (Melikoglu et al., 2013). Η βέλτιστη παραγωγή εξωκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης από *P. purpurogenum* και *Chaetomium thermophilum* var. *Coprophilum* επιτεύχθηκε μετά από 96 και 140 ώρες, αντίστοιχα (Venturi et al., 2002). Η βέλτιστη παραγωγή μιας εξωκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης από *Fusarium solani*, *Lichtheimia ramosa* και *Thermomucor indicae-seudaticae* επιτεύχθηκε στις 72, 96 και 196 ώρες σε SSF (Raza et al., 2011, Ling et al., 2011, Abdella et al., 2016). Επιπλέον, άλλες παράμετροι όπως το μέγεθος του εμβολίου, η περιεκτικότητα σε υγρασία, οι μέθοδοι ζύμωσης, ο όγκος ζύμωσης, το μέγεθος του ζυμωτήρα, η συγκέντρωση του υποστρώματος, τα άλατα και την συγκέντρωσή τους, ο αερισμός και τα πρόσθετα επηρεάζουν την παραγωγή των ενζύμων όπως η β-γλυκοζιδάση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

5. Καθαρισμός της β-γλυκοσιδάσης

Η πλειοψηφία των βιομηχανικών εφαρμογών της β-γλυκοζιδάσης δεν απαιτεί καθαρή μορφή του ενζύμου. Ωστόσο, απαιτείται ένα πολύ καθαρό ένζυμο για βιοχημικό και μοριακό χαρακτηρισμό, διαλεύκανση της τρισδιάστατης δομής και σχέσεις δομής-λειτουργίας. Η β-γλυκοζιδάση έχει καθαριστεί από διαφορετικές πηγές που περιλαμβάνουν μύκητες, βακτήρια και ζύμη (Karnchanatat et al., 2007, Yoon et al., 2008, Yang et al., 2004). Το πρώτο στάδιο καθαρισμού/απομόνωσης συνήθως περιλαμβάνει την κλασμάτωση πρωτεϊνών από τη μικροβιακή καλλιέργεια χρησιμοποιώντας θειικό αμμώνιο σε 75% (Zhang et al., 2009), 80% (Gong et al.,

2014, Lin et al., 1999 Bhat et al., 1993, Liu et al., 2012), και 90% κορεσμό (Bai et al., 2013, Narasimha et al., 2016), υπερδιήθηση (Karnchanatat et al., 2007, Park et al., 2012), καταβύθιση με ακετόνη (Venturi et al., 2002), ή καταβύθιση με αιθανόλη (De Palma-Fernandez et al., 2002). Το επόμενο βήμα συνήθως περιλαμβάνει τη χρήση σάκων διαπίδυσης για την απομάκρυνση του θειικού αμμωνίου και άλλων ακαθαρσιών που υπάρχουν στο μέσο καλλιέργειας (Ranjitha et al., 2009, Zaidi et al., 2014). Περαιτέρω καθαρισμός γίνεται με χρωματογραφικές τεχνικές όπως χρωματογραφία διήθησης πηκτής, χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής, χρωματογραφία προσρόφησης, χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Yoon et al., 2008, Bhat et al., 1993, Karnaouri et al., 2013).

5.1 Χαρακτηριστικά β-γλυκοζιδασών

Ο χαρακτηρισμός των ενζύμων είναι μεγάλης σημασίας για τη διερεύνηση των βιοτεχνολογικών εφαρμογών τους. Χαρακτηρισμός β-γλυκοζιδασών από διάφορες πηγές έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Yang et al., 2014).

5.1.1 Μοριακό βάρος

Η β-γλυκοζιδάση ποικίλουν στο μοριακό τους βάρος ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, π.χ., γλυκοζυλίωση. Γενικά οι β-γλυκοζιδάσες που ανήκουν στην GH1 έχουν μοριακά βάρη 40-60 kDa (Wierzbicka et al., 2013, Kuo and Lee, 2007), ενώ οι β-γλυκοζιδάσες της GH3 έχουν μοριακό βάρος 65-90 kDa, αλλά επειδή αυτή η ομάδα ενζύμων είναι συνήθως γλυκοζυλιωμένα, η μοριακή τους μάζα κυμαίνεται από 110-130 kDa (Du et al., 2014, Tajima et al., 2001, Albaser et al., 2016). Η β-γλυκοζιδάση ποικίλει σε διάταξη τεταρτοταγούς δομής, για παράδειγμα έχουν αναφερθεί, μονομερή (Nijikken et al., 2007), διμερή (Hernández-Guzmán et al., 2016), τριμερή (Parry et al., 2001), τετραμερή (Choi et al., 2011) ένζυμα. Το φυσικό μοριακό βάρος επομένως μπορεί να είναι υψηλότερο από αυτό που βρίσκεται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Για παράδειγμα, η β-γλυκοζιδάση από το *P. italicum* είχε φυσικό μοριακό βάρος 354 kDa όπως προσδιορίζεται με χρωματογραφία μοριακής διήθησης και 88.5 kDa όπως φαίνεται από την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, υποδηλώνοντας ότι η φυσική πρωτεΐνη είναι ένα τετραμερές (Park et al., 2012). Ομοίως, το προβλεπόμενο

μοριακό βάρος από αλληλουχίες αμινοξέων μπορεί να διαφέρει από εκείνο που προσδιορίζεται από την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE λόγω μετα-μεταφραστικής τροποποίησης (Fang et al., 2014). Για παράδειγμα, οι Chen et al (2010) αναφέρουν ότι η β-γλυκοζιδάση από το *P. decumben* με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 96 kDa προσδιορίστηκε με SDS-PAGE στα 120 kDa. Δύο αλκαλικές β-γλυκοζιδάσες βρέθηκαν να έχουν μοριακά βάρη 27 και 26 kDa, αντίστοιχα (Jiang et al., 2011).

5.1.2 Εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα

Οι β-γλυκοζιδάσες με βάση την εξειδίκευσή τους ως προς το υπόστρωμα κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: (α) κελλοβιάσες οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση της κελλοβιόζης και ολιγοσακχαριτών. Παράδειγμα κελλοβιασών αποτελούν αυτές που έχουν απομονωθεί από *Cellulomonas biazotea* (Lau and Wong, 2001) και *A. niger* (Rajoka et al., 2006), (β) άρυλ-β-D-γλυκοζιδάσες οι οποίες δρουν μόνο σε άρυλ-β-D-γλυκοζίδια (π.χ. pNPG) όπως αυτές που έχουν απομονωθεί από *N. fischeri* NRRL181 (Kalyani et al., 2012) και *A. oryzae* (Kudo et al., 2015) και (γ) β-γλυκοζιδάσες με εξειδίκευση σε ευρύ φάσμα υποστρωμάτων οι οποίες υδρολύουν υποστρώματα με β(1-4), β(1-2), β(1-3), α(1-4), α(1-2), α(1-6) δεσμούς (Tiwari et al., 2013). β-γλυκοζιδάσες με εξειδίκευση σε ευρύ φάσμα υποστρωμάτων έχουν απομονωθεί από *F. oxysporum* (Christakopoulos et al., 1994), *P. thermophile* J18 (59), *P. italicum* (Park et al., 2012), *Penicillium simplicissimum* (Bai et al., 2013), *A. oryzae* (Riou et al., 1998), *Thermobifida fusca* (Spiridonov and Wilson, 2001).

5.1.3 Βέλτιστο pH και θερμοκρασία δράσης β-γλυκοζιδασών

Οι β-γλυκοζιδάσες έχουν ένα εύρος βέλτιστου pH που εξαρτάται από την προέλευσή τους. Γενικά οι β-γλυκοζιδάσες μυκητιακής προέλευσης έχουν βέλτιστο pH δράσης που κυμαίνεται από 4.0 έως 6.0 (Yang et al., 2007, Gong et al., 2014, Kalyani et al., 2012, Kamaruddin et al., 2015, Daroit et al., 2008). Εξαίρεση αποτελούν η β-γλυκοζιδάση του *T. cylindrosporum* Syzx4 με βέλτιστο pH δράσης το 2.4 (Zhang et al., 2009) καθώς και οι β-γλυκοζιδάσες των *Acremonium murorum* LPSC 927 και *Chaetomium globosum* με βέλτιστο pH δράσης 9.0 και 10.0 αντίστοιχα (Elíades et al., 2011, Ravindran et al., 2011).

Οι βακτηριακής προέλευσης β-γλυκοζιδάσες έχουν βέλτιστο pH δράσης που κυμαίνεται από 6.0 έως 7.0 (Du et al., 2014, Shipkowski and Brenchley, 2005, An et al., 2010, Zahoor et al., 2011), ενώ έχει αναφερθεί ότι οι β-γλυκοζιδάσες των βακτηρίων *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Hong et al., 2009), *Bacillus halodurans* (Naz et al., 2010) και *Klebsiella pneumoniae* (Ma et al., 2015), έχουν βέλτιστα pH 5, 8 και 10, αντίστοιχα.

Οι β-γλυκοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από τις ζύμες *A. pullulans*, *Candida peltata* και *Kluyveromyces marxianus* έχουν βέλτιστα pH 5, 5 και 5.5, αντίστοιχα (Saha et al., 1994, Saha and Bothast, 1996, Rajoka et al., 2004), ενώ το ένζυμο που έχει απομονωθεί από *Aureobasidium* sp έχει βέλτιστη τιμή pH δράσης ίση με 2.5 (Iembo et al., 2002).

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των β-γλυκοζιδασών ποικίλλει. Για παράδειγμα, β-γλυκοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από *F. velutipes* (Mallerman et al., 2015), *Daldinia eschscholzii* (Karnchanatat et al., 2007), *P. purpureogenum* (Dhake and Patil, 2005) έχουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 50°C, ενώ βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 60°C εμφανίζουν οι β-γλυκοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από *Ceriporiopsis subvermispora* (Magalhaes et al., 2006), and *Halothermothrix orenii* (Hassan et al., 2015). Οι β-γλυκοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από *A. niger* KCCM 11239 (Chang et al., 2012), and *T. aurantiacus* IFO9748 (Hong et al., 2007) εμφανίζουν βέλτιστη δραστηριότητα στους 70°C, ενώ η β-γλυκοζιδάση από τον υπερθερμόφιλο μικροοργανισμό *P. furiosus* έχει βέλτιστη θερμοκρασία δράσης 102-105°C (Kengen et al., 1993).

5.1.4 Αναστολή από τη γλυκόζη

Η δράση των μικροβιακής προέλευσης β-γλυκοζιδασών αναστέλλεται (παρεμποδίζεται) από τη γλυκόζη (Rani et al., 2015). Για παράδειγμα η γλυκόζη αποτελεί συναγωνιστικό αναστολέα της β-γλυκοζιδάσης του *F. oxysporum* με σταθερά παρεμπόδισης $K_i=2.05$ mM (Christakopoulos et al., 1994), ενώ αποτελεί μη-συναγωνιστικό αναστολέα της β-γλυκοζιδάσης του *P. Italicum* ($K_i=8.9$ mM) (Venturi et al., 2002). Άλλες β-γλυκοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από *Termitomyces cylearuts* (Sengupta et al., 1991), *Fomitopsis palustris* (Yoon et al., 2008), *Monascus purpureus* NRRL1992 (Daroit et al., 2008), *D. Eschscholzii* (Karnchanatat et al., 2007),

Gongronella butleri (Santos et al., 2016) και *Leuoconstic mesentenoide* (Gueguen et al., 1997) παρεμποδίζονται επίσης από τη γλυκόζη με σταθερές παρεμπόδισης να κυμαίνονται από 0.35-14.3 mM.

β-γλυκοζιδάσες με ανθεκτικότητα στη γλυκόζη έχουν απομονωθεί από *C. Peltata* (Saha et al., 1996), *A. unguis* NII-08123 (Rajasree et al., 2013), *A. niger* CCRC 31494 (Yan and Lin, 1997), *A. oryzae* (Riou et al., 1998) και *Penicillium funiculosum* NCL1 (Ramani et al., 2015). Επιπλέον οι β-γλυκοζιδάσες που ανήκουν στην οικογένεια GH1 βρέθηκε ότι ενεργοποιούνται από την παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης και είναι ανθεκτικές σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Επί παραδείγματι, η β-γλυκοζιδάση του *Microbispora bispora* ενεργοποιείται παρουσία 300 mM γλυκόζης (Wright et al., 1992) ενώ οι β-γλυκοζιδάσες των *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 και *T. aotearoense* ενεργοποιούνται παρουσία συγκεντρώσεων γλυκόζης < 200 και 250 mM γλυκόζης αντίστοιχα (Pei et al., 2012, Yang et al., 2015). Πρόσφατα η αντικατάσταση δύο αμινοξέων (Leu 167 και Pro 172) στην είσοδο του ενεργού κέντρου της εσωκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης του *T. reesei* (Bgl II) από Trp and Leu, αντίστοιχα βελτίωσε σημαντικά την ανθεκτικότητα του ενζύμου στη γλυκόζη (Guo et al. 2016).

Η αναστολή της δράσης των β-γλυκοζιδασών αποτελεί το σημαντικότερο εμπόδιο στην βιομετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε βιοκαύσιμα.

5.1.5 Σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες

Προκειμένου οι β-γλυκοζιδάσες να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή βιοκαυσίμων ή στη βιομηχανία αναψυκτικών και ποτών θα πρέπει να εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα κύρια προϊόντα ζύμωσης δηλ. αιθανόλη, μεθανόλη, βουτανόλη, οξικό οξύ (Riou et al., 1998, Santos et al., 1996). Επιπλέον στις αντιδράσεις σύνθεσης χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες προκειμένου να μετατοπιστεί η ισορροπία της αντίδρασης από την υδρόλυση στη σύνθεση (Deschrevel et al., 2003). Η δραστηριότητα της β-γλυκοζιδάσης του *A. niger* αυξάνεται κατά 30% και 80% παρουσία 30% αιθανόλης και μεθανόλης αντίστοιχα (Narasimha et al., 2016). Η δραστηριότητα της θερμοσταθερής β-γλυκοζιδάσης από *F. islandicum* αυξάνεται κατά 2, 5, 28, 10, 28 και 23% παρουσία 99% δεκαεξανίου, η-εξανίου, επτανίου, ισοοκτανίου, αμυλικής αλκοόλης και δεκανόλη-1, αντίστοιχα, ενώ παρεμποδίζεται

ελαφρά παρουσία 99% αιθανόλης, ακετονιτριλίου, ισοπροπανόλης, πυριδίνης, DMSO, ακετόνης διμέθυλοφορμαμίδιου και μεθανόλης (Jabbour et al., 2012). Η παρουσία μεθανόλης και η αιθανόλης (50%) αυξάνουν τη δραστικότητα της β-γλυκοσιδάσης του *F. velutipes* κατά 5 και 23%, αντίστοιχα (Mallerman et al., 2015). Η δραστικότητα της β-γλυκοζιδάσης του *A. oryzae* αυξήθηκε κατά 30% παρουσία 15% αιθανόλης (Riou et al., 1998), ενώ η δραστικότητα της β-γλυκοζιδάσης του *Melanocarpus* sp αυξήθηκε 1.5 φορές παρουσία 70% μεθανόλης και αιθανόλης (Kaur et al., 2007). Η δραστικότητα της β-γλυκοζιδάσης του *F. oxysporum* αυξήθηκε 2.2 φορές παρουσία 0.5 M βουτανόλης και 1.4 φορές παρουσία 1 M μεθανόλης (Christakopoulos et al., 1994). Η δραστικότητα της β-γλυκοζιδάσης του *M. thermophile* αυξάνεται παρουσία λκοολών χαμηλού μοριακού βάρους δηλ. αύξηση δραστικότητας κατά 1.4 φορές παρουσία 10% προπανόλης, 15% αιθανόλης και 20% μεθανόλης (Karnaouri et al., 2013). Η δραστικότητα της β-γλυκοζιδάσης του *Rhizomucor miehei* NRRL 5282 αυξάνεται κατά 40% παρουσία 15% αιθανόλης (Krisch et al., 2012).

5.1.6 Επίδραση ιόντων μετάλλων

Η β-γλυκοζιδάση είναι ένζυμο που δεν απαιτεί την παρουσία ιόντων μετάλλων για τη δράση του. Η παρουσία όμως ιόντων μετάλλων επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο β-γλυκοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από διάφορες πηγές. Η β-γλυκοζιδάση του *E. antarcticum* B7 ενεργοποιείται από την παρουσία ιόντων Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , και Li^{3+} και παρεμποδίζεται παρουσία ιόντων Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} (Crespim et al., 2016) ενώ η ανασυνδυασμένη β-γλυκοζιδάση του *M. thermophile* ενεργοποιείται από την παρουσία ιόντων Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} και Mn^{2+} και παρεμποδίζεται παρουσία ιόντων Ca^{2+} και Co^{2+} (Karnaouri et al., 2013). Η β-γλυκοζιδάση του *Ceriporiopsis subvermispora* ενεργοποιείται από την παρουσία ιόντων Mn^{2+} , Fe^{3+} και παρεμποδίζεται παρουσία ιόντων Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} και K^+ , ενώ η β-γλυκοζιδάση του *Pseudonocardia* sp. Gsoil 1536 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Co^{2+} , Na^+ , and Zn^{2+} και παρεμποδίζεται πλήρως παρουσία ιόντων Hg^{2+} (Du et al., 2014). Ο μηχανισμός αναστολής της δράσης της β-γλυκοζιδάσης από τα ιόντα μετάλλων δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Παρόλα αυτά είναι γνωστό ότι η αναστολή από τα ιόντα Hg^{2+} υποδεικνύει ότι απαιτούνται ομάδες θειόλης για τη δράση του ενζύμου ή

για τη διατήρηση της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης (Riou et al., 1998). Η παρεμπόδιση από τα ιόντα Cu^{2+} , Co^{2+} και Zn^{2+} υποδεικνύει ότι βασικά (Arg, Lys, His) και όξινα αμινοξέα (Asp, Glu) μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στο ενεργό κέντρο, ενώ η ενεργοποίηση του ενζύμου από ιόντα Ca^{2+} , K^{+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} and Na^{+} υποδεικνύει ότι η παρουσία των κατιόντων αυξάνει την δομική σταθερότητα του ενζύμου (Krisch et al., 2012, Ng et al., 2010).

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά μυκητιακών β-γλυκοζιδασών

Οργανισμός προέλευσης	Οικογένεια GH	Αριθμός υπομονάδων	MW (kDa)	pH opt	T opt	Εξειδίκευση υποστρώματος
<i>P. thermophile</i>		ομοδιμερές	197	6,2	75	Ευρέως υποστρώματος
<i>A. niger</i> Au0847	CH3	ετεροδιμερές	110+120	4,6	65	Ευρέως υποστρώματος
<i>P. italicum</i>		ομοτετραμερές	88,5/354	4,5	60	Ευρέως υποστρώματος
<i>P. simplicissimum</i>		μονομερές	126	4,8	60	Ευρέως υποστρώματος
<i>A. awamori</i> MIBA335	CH3	μονομερές	120	4,5	55	Ευρέως υποστρώματος
<i>A. oryzae</i>		μονομερές	43	5	50	Ευρέως υποστρώματος
<i>Fomitopsis palustri</i>	CH3	μονομερές	135	4,5	70	Κελλοβιόζη + p-NPG
<i>T. aurantiacus</i>	CH3	ομοτριμερές	120/350	4,5	80	Ευρέως υποστρώματος
<i>T. lanuginosus</i> -SSBP	CH3	ομοδιμερές	200	6	65	Ευρέως υποστρώματος
<i>Melanocarpus</i> sp.		μονομερές	92	6	60	Ευρέως υποστρώματος
<i>A. fumigatus</i> Z5	CH3	μονομερές	91,47	6	60	Ευρέως υποστρώματος
<i>Phoma</i> sp.	CH3	τετραμερές	110/440	4,5	60	Ευρέως υποστρώματος
<i>D. eschscholzii</i>	CH3	μονομερές	64,2	5	50	Ευρέως υποστρώματος
<i>P. purpurogenum</i>	CH3	μονομερές	89,6	4	32	Ευρέως υποστρώματος
<i>F. velutipes</i>		μονομερές	75	5-6	50	p-NPG
<i>P. piceum</i>	CH3	μονομερές	92	5	60	Ευρέως υποστρώματος
<i>P. decumbens</i>	CH3	μονομερές	120	4,8	70	Ευρέως υποστρώματος
<i>Penicillium citrinum</i>	CH3	μονομερές	72	5	70	Ευρέως υποστρώματος
<i>A. niger</i> NII-08121	CH3	μονομερές	120	4,8	70	Ευρέως υποστρώματος
<i>Paecilomyces Bainier</i>	CH3	μονομερές	115	3,5	60	Ευρέως υποστρώματος
<i>Termitomyces clypeatus</i>		συνολικό	6,68/116	5	45	Ευρέως υποστρώματος
<i>A. terreus</i> EMOO 6-4	CH3	μονομερές	120	5,5	35	p-NPG
<i>Agaricus bisporus</i>		ετεροδιμερές	62+46	4	55	Ευρέως υποστρώματος
<i>T. citrinoviride</i>	CH3	μονομερές	110	4	50	Ευρέως υποστρώματος
<i>Sporothrix schenckii</i> ,	CH3	διμερές	97/204,9	5,5	45	Ευρέως υποστρώματος

<i>Rhizomucor miehei</i>	CH3	ετεροδιμερές	82,3	5	70	Ευρέως υποστρώματος
<i>Stachybotrys icrobispora</i>	CH3	ετεροδιμερές	78	6	50	Ευρέως υποστρώματος
<i>P. funiculosum</i>	CH3	ετεροδιμερές	120	5	60	Ευρέως υποστρώματος
<i>A. niger</i> KCCM 11239	CH3	ετεροδιμερές	123	4	70	Ευρέως υποστρώματος
<i>F. proliferatum</i> ECU2042	CH3	ετεροδιμερές	78,7	5	50	Ευρέως υποστρώματος
<i>Humicola grisea</i>		ετεροδιμερές	57	6	50	Ευρέως υποστρώματος
<i>Penicillium janthinellum</i>		ετεροδιμερές	120	4,5	65	Ευρέως υποστρώματος

6. Εφαρμογές β-γλυκοζιδασών

Οι β-γλυκοζιδάσες είναι μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση μιας ποικιλίας άρυλ- και αλκυλ-γλυκοζιδίων, δισακχαριτών και κελλο-ολιγοσακχαριτών. Είναι ένα συστατικό του κυτταρινολυτικού ενζυμικού συστήματος και εμπλέκεται στην υδρόλυση της κελλοβιόζης και ολιγοσακχαριτών σε γλυκόζη, εξαλείφοντας έτσι την ανασταλτική δράση της κελλοβιόζης τόσο στις ενδο- όσο και στις εξω-γλυκανάσες. Εκτός από την υδρολυτική δράση, η β-γλυκοζιδάση, υπό ορισμένες συνθήκες, εμφανίζει συνθετική δράση. Ως αποτέλεσμα, η β-γλυκοζιδάση έχει ευρύ φάσμα πιθανών βιοτεχνολογικών εφαρμογών, μερικές από τις οποίες βασίζονται στην υδρολυτική δράση της και μερικές στη συνθετική δράση.

6.1. Εφαρμογές με βάση την υδρολυτική δράση

6.1.1. Παραγωγή βιοκαυσίμων

Η βιομετατροπή των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών προς βιοαιθανόλη περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (α) προκατεργασία (φυσική, χημική, βιολογική) για την απελευθέρωση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης από τη λιγνίνη, (β) ενζυμική υδρόλυση των πολυμερών για την παραγωγή άμεσα μεταβολίσιμων σακχάρων (εξόζες και πεντόζες), (γ) βιομετατροπή (ζύμωση) των παραγόμενων σακχάρων σε αιθανόλη και (δ) διαχωρισμός, καθαρισμός και απόσταξη της αιθανόλης.

Τρία είδη ενζύμων δρουν συνεργιστικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης: οι ενδο-β-1,4-γλουκανάσες (endoglucanases-EG, EC 3.1.2.4) προσβάλλουν εσωτερικά τις άμορφες περιοχές της αλυσίδας της κυτταρίνης, οι κελλοβιοϋδρολάσες ή εξωγλουκανάσες (cellobiohydrolases-CBH, EC 3.2.1.91) προσβάλλουν τα άκρα του πολυμερούς, απελευθερώνοντας κελλοβιόζη, η οποία τελικά διασπάται σε δύο μόρια γλυκόζης από τις β-γλυκοζιδάσες (β-glucosidases-BGL, EC 3.2.1.21) (Margeot et al. 2009).

Οι Meyer et al. (2009) αναφέρθηκαν στην "έννοια του ελάχιστου ενζυμικού κοκτέιλ" δηλ. στην εύρεση του ελάχιστου αριθμού ενζύμων που απαιτούνται για την αποτελεσματική αποικοδόμηση ενός υποστρώματος. Τα βασικά ένζυμα, σύμφωνα με τους Banerjee et al. (2010c) αποτελούνταν από δύο

κελλοβιοϋδρολάσες (CBH1 και CBH2 από το *T. reesei*), μία ενδογλουκανάση (EG1), μία β-γλυκοζιδάση, μία GH10 ενδο-β-1,4-ξυλανάση και μια β-ξυλοζιδάση.

Ωστόσο, η αναλογία της β-γλυκοζιδάσης είναι πενιχρή στην πλειοψηφία των εμπορικών σκευασμάτων κυτταρινολυτικών ενζύμων γεγονός που οδηγεί σε συσσώρευση κελλοβιόζης αναστέλλοντας έτσι τη δράση των ενδο και εξω-γλυκανασών. Στο *T. reesei*, η αναλογία αυτών των ενζύμων είναι ενδογλουκανάσες (18%), κελλοβιοϋδρολάσες (72%) και β-γλυκοζιδάσες (<1%). Η β-γλυκοζιδάση από *A. niger* γενικά χρησιμοποιείται για να συμπληρώσει το κυτταρινολυτικό κοκτέιλ του *T. reesei*.

Επομένως, προσθέτοντας β-γλυκοζιδάση στο ενζυμικό μείγμα ή χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς με επιθυμητό ποσοστό β-γλυκοζιδάσης στο κυτταρινολυτικό τους σύστημα θα οδηγήσει σε αύξηση των αποδόσεων υδρόλυσης των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών.

6.1.2. Άλλες εφαρμογές

Η συμβολή της β-γλυκοζιδάσης στην υδρόλυση της κυτταρίνης είναι σημαντική επειδή η κελλοβιόζη είναι ένας αναστολέας τόσο των ενδο- όσο και των εξω-γλυκανασών, και πρέπει να αφαιρεθεί για να επιτρέψει την αποτελεσματική και πλήρη σακχαροποίηση της κυτταρίνης. Για παράδειγμα, σε εμπορική σκεύασμα κυτταρινάσης από τον *T. reesei*, η ενεργότητα των β-γλυκοζιδασών είναι αρκετά χαμηλή, και αυτό περιορίζει το ρυθμό και την έκταση της παραγωγής γλυκόζης. Η συμπλήρωση β-γλυκοσιδάσης ήταν ευεργετική για ζώα με μονή στένωση όπως οι χοίροι και τα κοτόπουλα (Leclerc et al., 1987; Zhang et al., 1996) όπου η αποικοδόμηση της κυτταρίνης ενισχύθηκε από το κύριο ένζυμο για καλύτερη χρήση των θρεπτικών ουσιών. Συνεπώς, το "Barlican", ένα μη τοξικό ενζυμικό παρασκεύασμα από τον *T. Reesei*, που περιέχει ένζυμα υδρόλυσης κυτταρίνης, έχει αναφερθεί ότι είναι ασφαλές για χρήση ως πρόσθετο (Coenen et al., 1995).

Μεταξύ άλλων υποψηφίων για υδρολυτική επίθεση από β-γλυκοζιδάσες είναι φλαβονοειδείς και ισοφλαβονοειδείς γλυκοζίτες. Αυτά είναι φαινολικοί και φυτοοιστρογονικοί γλυκοζίτες που απαντώνται φυσιολογικά σε φρούτα, λαχανικά, τσάι, κόκκινο κρασί, και σόγια. Η μονάδα αγλυκόνης, που απελευθερώνεται ως αποτέλεσμα της υδρολυτικής δραστηριότητας των β-γλυκοζιδασών, έχει ισχυρή

βιολογική δραστηριότητα, με πολλές χρήσεις στον τομέα της ιατρικής ως αντικαρκινικών παραγόντων, στη γενική βιοϊατρική έρευνα και στη βιομηχανία τροφίμων. Η υδρόλυση της δαϊνζίνης και της γενιστίνης σε δαϊνζένιο και γενιστένιο, αντίστοιχα, με την απελευθέρωση γλυκόζης καταδείχθηκε με το ένζυμο του υποείδους *ramnosus* του *Lactobacillus casei*, μειώνοντας έτσι τους ανεπιθύμητους πικρούς και στυπτικούς ισοφλαβανοειδείς γλυκοζίτες από μαγειρεμένο σιρόπι σόγιας (SCS) (Matsuda et al., 1994). Παρομοίως, η φλοριζίνη υδρολύθηκε για να απελευθερώσει την μονάδα αγλυκόνης, η οποία είναι πρόδρομος της μελανίνης. Η τελευταία είναι γνωστό ότι μειώνει τον κίνδυνο καρκίνου του δέρματος και προωθεί το σκούρο χρώμα μαλλιών (Ridgway et al., 1997).

Στη βιομηχανία τροφίμων, η εφαρμογή της γελλάνης, ένας εξωπολυσακχαρίτης που παράγεται από το *Sphingomonas raucimobilis*, είναι πολύ περιορισμένη λόγω του υψηλού ιξώδους και της χαμηλής διαλυτότητάς της. Η υδρολυτική δράση των β-γλυκοζιδασών μπορεί να είναι χρήσιμη στην παραγωγή τροφίμων γελλάνης χαμηλού ιξώδους. Για παράδειγμα, οι ενδοκυτταρικές β-γλυκοζιδάσες που παράγονται από το *Bacillus* sp. έδειξαν ότι καταλύουν την διάσπαση της τρισακχαριδικής γλυκοσυλ-ραμνοσυλ-γλυκόζης (που παράγεται από τη δράση της λυάσης γελλάνης και εξωκυτταρικών γλυκοζιδασών) προς απελευθέρωση γλυκόζης και ραμνοσυλ-γλυκόζης, μειώνοντας έτσι το ιξώδες. Οι β-γλυκοζιδάσες συσχετίζονται επίσης με την απομάκρυνση της πικρίας από τους χυμούς εσπεριδοειδών καταλύοντας την υδρόλυση της ναρινγκίνης (4,5,7-τριυδροξυφλαβανόνη-7-ραμνογλυκοζίδιο) σε προυνίνη (Roitner et al., 1984).

Μια ποικιλία τροφίμων όπως μήλα, σταφύλια, χυμοί φρούτων και οίνοι είναι γνωστό ότι περιέχουν ένα ελεύθερο κλάσμα πτητικών τερπενολών, καθώς και φυσικούς μη εύοσμους και μη πτητικούς πρόδρομους γλυκοζίτες. Αυτά είναι μια σημαντική πηγή αρωματικών ενώσεων. Χημικά, η μονάδα αγλυκόνης του προδρόμου γλυκοζίτη συνδέεται με τους δισακχαρίτες 6-O-α-ραμνοπυρανοζυλ β-D-γλυκοζίδιο και 6-O-α-L-αραβινοπυρανοσυλ β-D-γλυκοζίδιο. Το συστατικό αγλυκόνης μπορεί να είναι μια πτητική φαινόλη όπως βανιλίνη, αλειφατικές ή κυκλικές αλκοόλες όπως εξανόλη, 2-φαινυλαιθανόλη, βενζυλική αλκοόλη ή τερπενόλες όπως νερόλη, λιναλοόλη, γερανιόλη και σιτρονελλόλη (Gunata et al., 1985). Η υδρόλυση των γλυκοζιδικών δεσμών με ενδογενείς φυτικές β-γλυκοζιδάσες προκαλούν την

απελευθέρωση του τμήματος αγλυκόνης (δηλαδή, διάφορες αρωματικές αλκοόλες). Ωστόσο, στη φύση η διαδικασία αυτή είναι γενικά αργή και αδυνατεί να απελευθερώσει το σύνολο της γευστικής δεξαμενής. Η συμπλήρωση με β-γλυκοζιδάσες από εξωτερικές πηγές μπορεί να βελτιώσει την απελευθέρωση αρωμάτων, ωφελώντας έτσι τη διαδικασία οينوποίησης. Για να το καταδειχθεί αυτό, αρκετές εφαρμογές μικρής κλίμακας δοκιμάστηκαν, προκειμένου να απελευθερωθούν οι δεσμευμένες ενώσεις που προσδίδουν άρωμα.

Σε μια πρόσφατη εφαρμογή της υδρολυτικής δράσης της β-γλυκοζιδάσης, η βιομετατροπή της ολεουροπεΐνης (γλυκοζυλιωμένος ετεροζιδικός εστέρας ελενολικού οξέος και 3,4 διυδροξυ φαινυλαιθυλαιθανόλη ή υδροξυτυροσόλη) που προκαλεί πικρία σε άγουρες ελιές πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένη β-γλυκοζιδάση από το θερμόφιλο *Sulfolobus solfataricus*. Η μονάδα αγλυκόνης που απελευθερώνεται λόγω της διάσπασης είναι μια φαρμακολογικώς δραστική ένωση χρήσιμη στην πρόληψη της στεφανιαίας νόσου και του καρκίνου (Briante et al., 2000). Η πλήρης αποτοξίνωση της κασάβας (η τέταρτη μεγαλύτερη πηγή θερμίδων στις τροπικές περιοχές) μπορεί να επιτευχθεί μόνο μετά τη συμπλήρωση με β-γλυκοζιδάσες από μικροβιακές πηγές όπως το *Leuconostoc mesenteroides*. Αυτές κατέλυσαν την υδρόλυση κυανογόνων-γλυκοζιδίων όπως λιναμαρίνη, κυανοϋδρίνη και λοταστραλίνη για να απελευθερωθεί το τοξικό τμήμα -CN, κάνοντας έτσι την κασάβα κατάλληλη για κατανάλωση από τον άνθρωπο (Gueguen et al., 1997).

6.2. Εφαρμογές με βάση τη συνθετική δράση των γλυκοζιδασών

Η συνθετική δράση της β-γλυκοζιδάσης αναφέρεται στην σύνθεση άλκυλ- και άρυλ-γλυκοζιδίων και ολιγοσακχαριτών. Τα άλκυλ- και άρυλ-γλυκοζίδια βρίσκουν εφαρμογές στην ιατρική και τη φαρμακευτική. Τα άλκυλ- και άρυλ-β-γλυκοσίδια είναι μη ιονικά επιφανειοδραστικά, χημικώς σταθερά, βιοαποικοδομήσιμα με αντιμικροβιακή δράση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανίες απορρυπαντικών, φαρμακευτικών προϊόντων, τροφίμων και καλλυντικών. Από την άλλη πλευρά, οι συνθετικοί ολιγοσακχαρίτες έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, ιδιαίτερα στη βιοϊατρική επιστήμη ως θεραπευτικοί παράγοντες, παράγοντες προαγωγής ανάπτυξης προβιοτικών βακτηρίων, εμβόλια και διαγνωστικά εργαλεία.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

1. Όργανα

- Φωτόμετρο (Hitachi UV 2000)
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας
- microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices)
- αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0.1 mg
- Θερμοστατούμενος περιστροφικός αναδευτήρας (Zhicheng 211C, Κίνα, LABLINE Incubator-Shaker, Η.Π.Α.)
- Vortex
- Φυγόκεντρος
- HiPrep 16/10 Butyl FF column (1.6×10 cm GE Healthcare)
- Q-Sepharose column (2.8×19.3 cm)
- Περισταλτική αντλία Bio-Rad
- Θάλαμος ηλεκτροφόρησης Bio-Rad
- Αναδευόμενος θάλαμος υπερδιήθησης Amicon

2. Μικροοργανισμοί

Χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Raecilomyces variotii* (φυσικού τύπου), ο οποίος έχει απομονωθεί (από αποσυντιθέμενη βιομάζα) και χαρακτηρίζεται από το Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

3. Αερόβια ανάπτυξη του μύκητα *Raecilomyces variotii* και παραγωγή κυτταρινασών σε βυθισμένη καλλιέργεια

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου (εκτός της πηγής άνθρακα) που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξή του σε βυθισμένη καλλιέργεια, παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Το pH του μέσου ρυθμίστηκε στο 6.0. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε άχυρο σίτου (wheat straw), άχυρο κριθαριού (barley straw), άξονας σπάδικα αραβόσιτου (corn cobs) πίτουρο σίτου (wheat bran, WB), αλκαλικά προκατεργασμένο άχυρο σίτου (ATWS) και αλκαλικά προκατεργασμένου άξονα σπάδικα αραβόσιτου (ATCC). Η ανάπτυξη έγινε σε κωνικές φιάλες των 250ml. Η αποστείρωση του μέσου πραγματοποιήθηκε στους 121°C για 30 min. Το εμβόλιο του μικροοργανισμού ήταν

1ml και η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 35°C για 7 ημέρες. Δείγματα λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των κυτταρινασών.

Πίνακας 3: Σύσταση θρεπτικού μέσου καλλιέργειας

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
MgSO₄·7H₂O	0.5
KH₂PO₄	1.0
NaCl	0.3
CaCl₂	0.1
Vitamin solution	1 mL/L
Hunter's trace elements solution	1 mL/L
NH₄NO₃	6

4. Εμβόλιο

Ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε τρυβλία που περιείχαν 39 g/L άγαρ δεξτρόζης πατάτας. Το μυκητιακό αιώρημα αποκτήθηκε με προσθήκη διαλύματος 0,1% Tween 80 στα τρυβλία και ξύσιμο τους ώστε να περάσουν τα κύτταρα στην υδατική φάση.

5. Μέτρηση ενεργότητας ενζύμων

Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (U) ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol προϊόντος / min, στους 50 °C, σε pH 6.0.

5.1. Μέτρηση ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης

Η ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης μετρήθηκε με επώαση του ενζύμου σε 1mM *p*-νιτροφαινυλ-β-D- γλυκοκυρανοσίδιο (*p*NPG) για 10 min στους 50°C. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με προσθήκη 30% (β/ο) ανθρακικού νατρίου και η *p*-νιτροφαινόλη που απελευθερώθηκε προσδιορίστηκε από την απορρόφηση στα 410 nm.

5.2. Μέτρηση ενεργότητας ενδογλουκανάσης

Η ενεργότητα της ενδογλουκανάσης, μετρήθηκε με επώαση του ενζύμου σε διάλυμα 2% (β/ο) καρβόξυ-μέθυλο-κυτταρίνης (Sigma, low viscosity), όπως περιγράφεται σε άλλες εργασίες (Chistakopoulos *et al.* 1995, Kalogeris *et al.* 1998). Τα απελευθερωθέντα σάκχαρα μετρήθηκαν με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959).

5.3. Μέτρηση ενεργότητας εξωγλουκανάσης

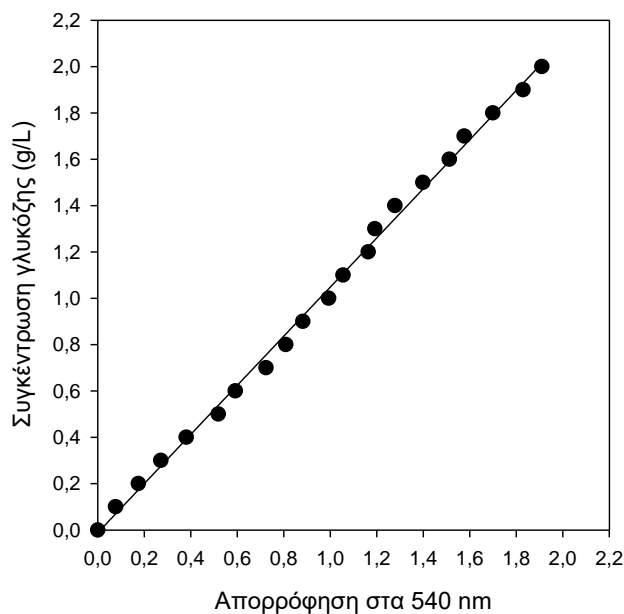
Η ενεργότητα της ενδογλουκανάσης μετρήθηκε με επώαση του ενζύμου σε 1% β/ο Avicel (μικροκρυσταλλική κυτταρίνη). Τα απελευθερωθέντα σάκχαρα μετρήθηκαν με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959).

5.4. Μέτρηση ενεργότητας κυτταρινασών

Η ενεργότητα των συνολικών κυτταρινασών μετρήθηκε με επώαση του ενζύμου σε 50 mg/mL Whatman No1 σε ρυθμιστικό διάλυμα. Τα απελευθερωθέντα σάκχαρα μετρήθηκαν με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959).

6. Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων

Ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (ή 2-υδρόξυ-3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ) (Miller, 1959). Στο Διάγραμμα 1, παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς των αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης.



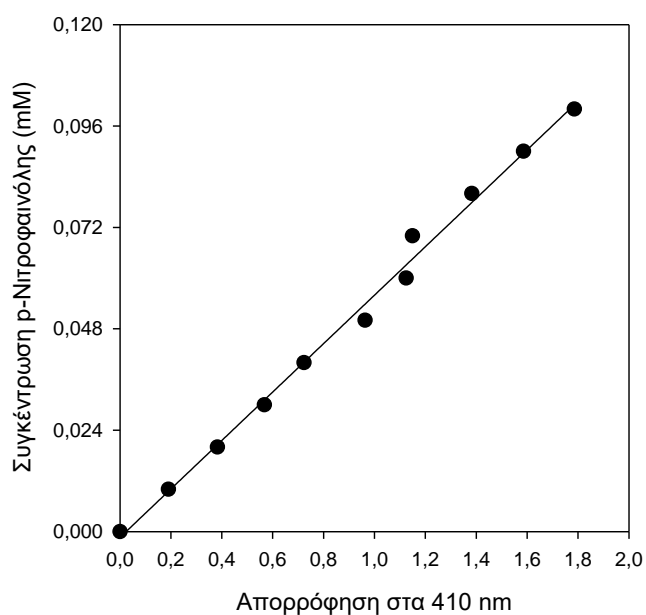
Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς ισοδύναμων γλυκόζης με τη μέθοδο DNS

Η εξίσωση της καμπύλης είναι

$$y = 1.0606 \cdot \text{ABS}_{540} - 0.0119 \quad (R^2 = 0.9972)$$

7. Καμπύλη αναφοράς p-νιτροφαινόλης

Ο προσδιορισμός της p-νιτροφαινόλης πραγματοποιείται με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 410 nm. Στο Διάγραμμα 2, παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς της p-νιτροφαινόλης.



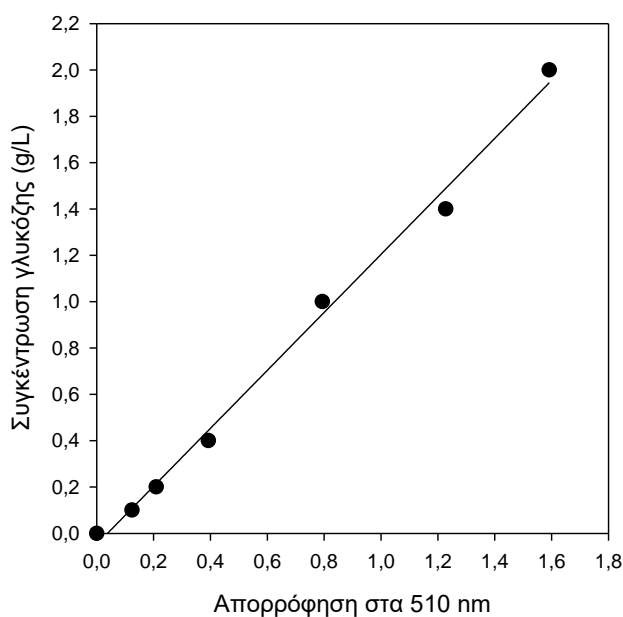
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς p-νιτροφαινόλης

Η εξίσωση της καμπύλης είναι

$$y=0.0573\text{ABS}_{410} - 0.0014 \text{ (R}^2 = 0.9942\text{)}$$

8. Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit)

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος, το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης. Αρχικά, η γλυκόζη, με τη δράση της οξειδάσης της γλυκόζης, μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ με την ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ακολούθως, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, παρουσία αμινοφαιναζόνης και κάποιου φαινολικού παραγώγου, με τη δράση της υπεροξειδάσης, μετατρέπεται σε κάποιο προϊόν ερυθρού χρώματος, το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης γίνεται με τη βοήθεια microplate reader. Στο Διάγραμμα 3, παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης.



Διάγραμμα 3: Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης

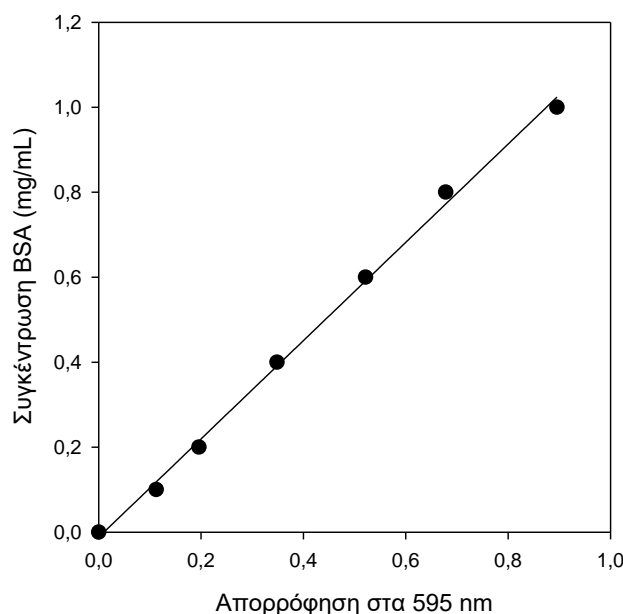
Η εξίσωση της καμπύλης είναι

$$y=1.2513 \cdot \text{ABS}_{510} - 0.0472 \text{ (R}^2 = 0.9947\text{)}$$

9. Μέτρηση πρωτεΐνης

Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης έγινε με τη μέθοδο Bradford (Bradford *et al.*, 1976).

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις της αλβουμίνης ορού βοδινού (Bovine Serum Albumin, BSA). Στο Διάγραμμα 4, φαίνεται η καμπύλη αναφοράς της πρωτεΐνης.



Διάγραμμα 4: Καμπύλη αναφοράς πρωτεΐνης (BSA)

Η εξίσωση της καμπύλης είναι

$$y = 1.1375x \quad (R^2 = 0.997)$$

Κατά την απομόνωση των ενζύμων η παρακολούθηση των εκλουόμενων πρωτεϊνών έγινε με μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm.

10. Απομόνωση του ενζύμου

Η καλλιέργεια διηθήθηκε για την απομάκρυνση του στερεού υποστρώματος και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για την απομάκρυνση των κυττάρων στα 20000 rpm.

10.1. Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο

Στην υγρή φάση της καλλιέργειας προστέθηκε $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε τελικό κορεσμό 90%. Ύστερα από φυγοκέντρηση παραλήφθηκε το ίζημα στο οποίο υπήρχαν οι καταβυθισμένες πρωτεΐνες και επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα πιπεραζίνης 20 mM (pH 7.0).

10.2 Διαπίδυση

Το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται σε σάκο διαπίδυσης και τοποθετείται στο ρυθμιστικό διάλυμα πιπεραζίνης 20 mM (pH 7.0) στους 4 °C.

10.3 Χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής

Το διάλυμα εισήχθη σε ανιοντική ρητίνη Q-sepharose (2.8×19.3 cm) η οποία είχε εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα πιπεραζίνης 20 mM (pH 7.0). Η στήλη εκλούστηκε αρχικά με 150 mL ρυθμιστικού διαλύματος πιπεραζίνης 20 mM (pH 7.0) για 40 min. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε γραμμική διαβαθμίση της συγκέντρωσης του NaCl (το οποίο είχε παρασκευαστεί στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα) από 0 σε 1 M σε χρόνο 75 min. Η ροή ήταν 4 mL/min και τα κλάσματα που ελήφθησαν είχαν όγκο 12 mL. Τα κλάσματα που είχαν ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης συγκεντρώθηκαν και συμπυκνώθηκαν σε όγκο 10 mL με την χρήση της συσκευής amicon με φίλτρο 30 kDa. Περαιτέρω συμπύκνωση πραγματοποιήθηκε με Centricut W-10 σε όγκο 2 mL.

10.4 Χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων

Το διάλυμα των πρωτεϊνών μετά από εξισορρόπηση του pH σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM (pH 7.0) που περιείχε θειικό αμμώνιο 1.5 M, εισήχθη σε στήλη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων HiPrep 16/10 Butyl FF, η οποία είχε εξισορροπηθεί με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά από έκπλυση της στήλης με 100 mL του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 100 mM (pH 7.0) που περιείχε θειικό αμμώνιο 1.5 M, για 50 min εφαρμόστηκε γραμμική βαθμίδωση της συγκέντρωσης του $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ από 1.5 έως 0 M σε χρόνο 100 min. Η ροή ήταν 2 mL/min και ο όγκος των κλασμάτων ήταν 6 mL.

10.5 Συμπύκνωση

Τα κλάσματα που έδειξαν ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης συγκεντρώθηκαν και συμπυκνώθηκαν με τη χρήση αναδευόμενου θαλάμου υπερδιήθησης amicon με μεμβράνη 30 kDa.

11. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Η καθαρότητα των διαλυμάτων μετά από κάθε στήλη ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος δωδεκυλοθειικού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Η χρώση των πηκτωμάτων έγινε με νιτρικό άργυρο και με κυανό του Coomassie.

11.1. Εμφάνιση των πρωτεϊνών στην ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Μετά το τέλος των ηλεκτροφορήσεων, η εμφάνιση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο βαφής με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250, στην περίπτωση όπου η συγκέντρωση των πρωτεϊνών ήταν μεγαλύτερη από 2 $\mu\text{g}/\text{πρωτεΐνη}$. Για μικρότερες συγκεντρώσεις (15 mg έως 2 mg πρωτεΐνης), πραγματοποιήθηκε χρώση των πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο (Blum et al., 1987), η οποία παρουσιάζει 100-1000 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τη μέθοδο βαφής με Coomassie Brilliant Blue R-250.

11.1.1. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue

Η χρώση των πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue στηρίζεται στην αλληλεπίδραση των όξινων και βασικών ομάδων των αμινοξέων των πρωτεϊνών με τις οργανικές ομάδες των χρωστικών, σχηματίζοντας με τον τρόπο αυτό χρωματισμένα ιζήματα. Αρχικά, η πηκτή εμβαπτιζόταν σε διάλυμα που περιείχε 45% (v/v) CH_3OH , 10% (v/v) CH_3COOH και 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue για 20 min περίπου. Ακολουθούσε αποχρωματισμός της πηκτής με διαδοχικές πλύσεις αυτής με διάλυμα 45% (v/v) CH_3OH και 10% (v/v) CH_3COOH . Η διαδικασία του αποχρωματισμού σταματούσε με την εμφάνιση των πρωτεϊνών και τη μείωση του μπλε χρώματος στο υπόβαθρο της πηκτής. Όλα τα στάδια της χρώσης πραγματοποιούνταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε ανακινούμενη συσκευή.

11.1.2 Χρώση με νιτρικό άργυρο

Η χρώση με νιτρικό άργυρο βασίζεται στην ιδιότητα των ιόντων αργύρου να αντιδρούν με τις πρωτεΐνες και κυρίως με τις ελεύθερες αμινομάδες και τις θειούχες ομάδες τους. Εν συνεχεία, τα ιόντα του αργύρου ανάγονται, με

φορμαλδεΐδη, σε μεταλλικό άργυρο και έτσι εμφανίζεται η χρώση. Αναλυτικότερα, η διαδικασία που εφαρμόστηκε είναι η ακόλουθη:

Αρχικά, πραγματοποιούνταν στερέωση των πρωτεϊνών με διάλυμα 40% (v/v) αιθανόλης και 10% (v/v) οξικού οξέος. Στη συνέχεια το οξικό οξύ απομακρυνόταν με δύο πλύσεις των 30 min με νερό. Ακολουθούσε εμβάπτισή της πηκτής σε διάλυμα 0.02% (w/v) θειοθειικού νατρίου. Το θειοθειικό νάτριο απομακρυνόταν με τρεις πλύσεις της πηκτής με νερό για 20 sec. Η πηκτή επωζόταν σε διάλυμα νιτρικού αργύρου 0.1% (w/v) στο οποίο είχε προστεθεί 0.002% (v/v) φορμαλδεΐδη. Η επώαση της πηκτής διαρκούσε 20 min, ακολουθούσε πλύση με νερό για 20 sec και εμφάνιση των ζωνών με διάλυμα 3% (w/v) Na_2CO_3 και 0.05% (v/v) φορμαλδεΐδης. Μετά την εμφάνιση των ζωνών η πηκτή ξεπλενόταν με νερό και επωζόταν σε διάλυμα οξικού οξέος 5% (v/v) για 5 min. Όλα τα στάδια της χρώσης πραγματοποιούνταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε ανακινούμενη συσκευή.

12. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα και την σταθερότητα του ενζύμου

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα μετρήθηκε με επώαση του ενζύμου σε διάφορες θερμοκρασίες από 30 °C έως 80 °C για 10 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – φωσφορικού νατρίου 100 mM (pH 4.5) χρησιμοποιώντας 1 mM pNPG ως υπόστρωμα. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην σταθερότητα πραγματοποιήθηκε με παραμονή της β-γλυκοζιδάσης στην εκάστοτε θερμοκρασία σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – φωσφορικού νατρίου 100 mM (pH 4.5) και η εναπομείνουσα ενεργότητα μετρήθηκε με 1 mM pNPGlc σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – φωσφορικού νατρίου 100 mM (pH 4.5).

13. Επίδραση του pH στην ενεργότητα και την σταθερότητα του ενζύμου

Η επίδραση του pH στην ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίσθηκε με μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας σε διάφορες τιμές pH για 10 λεπτά στους 50 °C, σύμφωνα με τη μέθοδο προσδιορισμού που περιγράφεται νωρίτερα. Η σταθερότητα pH της β-γλυκοζιδάσης εξετάστηκε μετά την επώαση του ενζύμου σε διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα 100 mM σε διαφορετικές τιμές pH για περίπου 24 ώρες στους 4 °C και

εξετάζοντας τις εναπομείνουσες ενεργότητες χρησιμοποιώντας 1 mM pNPG ως υπόστρωμα σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – φωσφορικού νατρίου 100 mM (pH 4.5). Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ρυθμιστικό ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – φωσφορικού νατρίου 100 mM (pH 3-6.5) και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM (pH 6.5-7.5).

14. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών

Για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα το pNPG και η κελλοβιόζη. Για τον προσδιορισμό στο pNPG, το ένζυμο επώαστηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις pNPG 0.05-5 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – φωσφορικού νατρίου 100 mM (pH 4.5) στους 50 °C. Για τον προσδιορισμό στην κελλοβιόζη, το ένζυμο επώαστηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις κελλοβιόζης 0.05-5 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – φωσφορικού νατρίου 100 mM (pH 4.5) στους 50 °C.

15. Παρεμπόδιση από το προϊόν

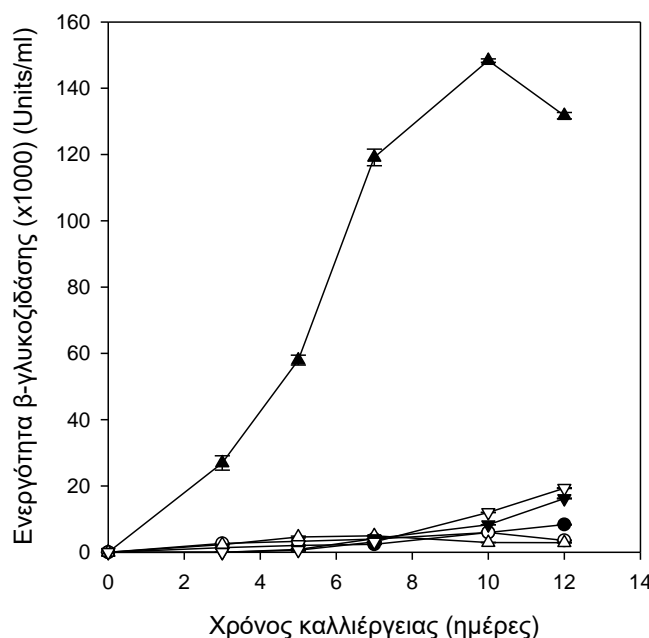
Μετρήθηκε η παρεμπόδιση του ενζύμου από τη γλυκόζη με προσθήκη διάφορων συγκεντρώσεων γλυκόζης 0-40 mM σε 0.5 mM pNPG σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – φωσφορικού νατρίου 100 mM (pH 4.5) στους 50 °C.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Παραγωγή β-γλυκοζιδάσης από το μύκητα *Paecilomyces variotii*

1.1 Επίδραση της πηγής άνθρακα

Μελετήθηκε η παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης από το μύκητα *Paecilomyces variotii*. Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση του είδους της πηγής άνθρακα στην παραγωγή του ενζύμου. Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υποστρώματα: α) άχυρο σίτου (wheat straw), (β) άχυρο κριθαριού, (γ) άξονας σπάδικα αραβόσιτου (corn cobs), (δ) πίτυρο σίτου (wheat bran), (ε) αλκαλικά επεξεργασμένο άχυρο σίτου (ATWS), (στ) αλκαλικά επεξεργασμένος άξονας σπάδικα αραβόσιτου (ATCC). Ακολουθούν τα αποτελέσματα της παραγωγής, καθώς και ο σχολιασμός και τα συμπεράσματα αυτών.

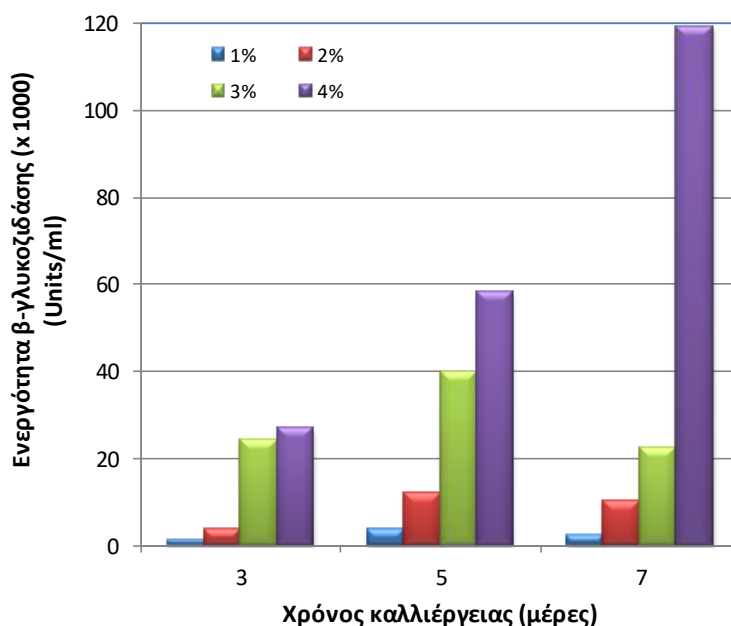


Διάγραμμα 5. Επίδραση της είδους της πηγής άνθρακα στην παραγωγή β-γλυκοζιδάσης από το μύκητα *P. variotii*. Σύμβολα: (●) άχυρο σίτου, (○) άχυρο κριθαριού, (▲) άξονας σπάδικα αραβόσιτου, (△) πίτυρο σίτου, (▼) αλκαλικά επεξεργασμένο άχυρο σίτου και (▽) αλκαλικά επεξεργασμένος άξονας σπάδικα αραβόσιτου.

Από το Διάγραμμα 5 παρατηρείται ότι η βέλτιστη πηγή άνθρακα για την παραγωγή β-γλυκοζιδάσης είναι ο άξονας σπάδικα αραβόσιτου (corn cobs). Στις υπόλοιπες πηγές η παραγωγή β-γλυκοζιδάσης είναι ελάχιστη και αυξάνεται μετά από την έβδομη ημέρα για τον αλκαλικά επεξεργασμένο άξονα σπάδικα και το αλκαλικά επεξεργασμένο άχυρο σίτου.

1.2 Επίδραση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα

Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του άξονα σπάδικα αραβόσιτου που επελέγει ως η καλύτερη πηγή άνθρακα από το προηγούμενο στάδιο. Εξετάστηκαν οι κάτωθι συγκεντρώσεις: 1% (β/ο), 2% (β/ο), 3% (β/ο) και 4% (β/ο). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6. Επίδραση της συγκέντρωσης του άξονα σπάδικα αραβόσιτου στην παραγωγή β-γλυκοζιδάσης από το μύκητα *P. variotii*.

Παρατηρήθηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση πηγής άνθρακα είναι 4% β/ο. Στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις παρατηρείται μια αύξηση της παραγόμενης ενεργότητας την 5^η ημέρα και έπειτα πτώση την 7^η.

Η ενεργότητα που επιτεύχθηκε στην παρούσα εργασία από τον άξονα σπάδικα αραβόσιτου ήταν 0.12 Units/ml. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι ενεργότητες β-γλυκοζιδάσης διαφόρων μυκήτων σε διάφορες πηγές άνθρακα. Παρόμοιες τιμές ενεργοτήτων επιτεύχθηκαν από τους Bai et al. (2013) από τον μύκητα *Penicillium simplicissimum* σε υπόστρωμα που περιείχε πίτυρο σίτου, άχυρο ρυζιού και κέικ φασολιών (0.15 Units/ml) και από τους Lan et al. (2013) από τον μύκητα *Trichoderma viridi* με πηγή άνθρακα βαγάσση ζαχαροκάλαμου και πίτυρο σίτου (0.25 Units/ml).

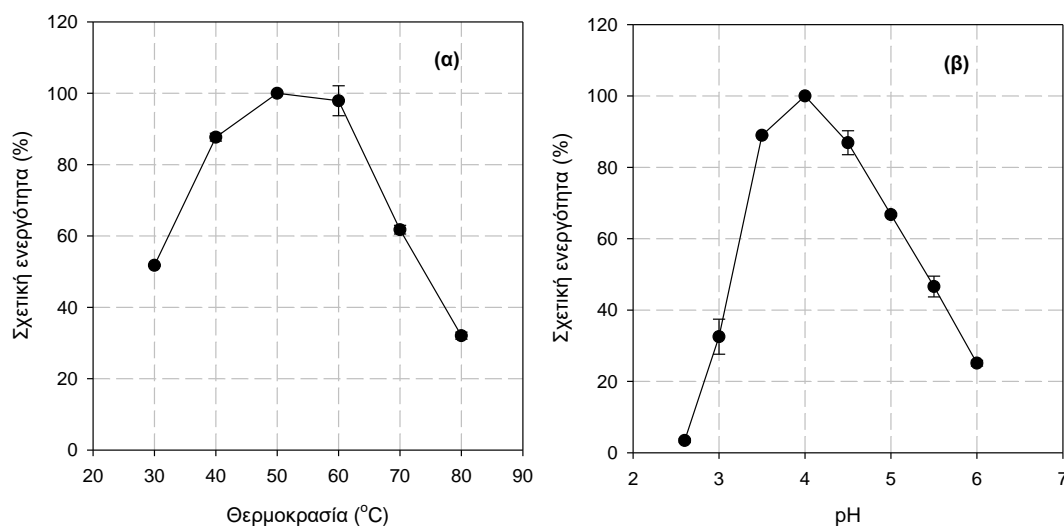
Πίνακας 3. Παραγωγή β-γλυκοζιδάσης από μύκητες σε βυθισμένη καλλιέργεια με χρήση διαφόρων πηγών άνθρακα

Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	Ενεργότητα (Units/ml)	Αναφορά
<i>Aspergillus phoenicis</i>	Πίτυρο σίτου	4.0	Jager et al., 2001
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 3112	Πίτυρο σίτου + γλυκερόλη	10.8	Abdella et al., 2016
<i>Aspergillus oryzae</i> 3T5B8	Βαγάσση ζαχαροκάλαμου	5.0	Vasconcellos et al., 2015
<i>Aspergillus wentii</i>	Κυτταρίνη	10.0	Srivastava et al., 1981
<i>Trichoderma viridi</i>	Βαγάσση ζαχαροκάλαμου + πίτυρο σίτου	0.26	Lan et al., 2013
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Πίτυρο σίτου + άχυρο ρυζιού + κέικ φασολιών	0.15	Bai et al., 2013
<i>Penicillium funiculosum</i>	Avicel	2.4	Carvalho et al., 2014
<i>Penicillium janthinellum</i>	Άχυρο ρυζιού	0.3	Sharma et al., 2015
<i>Fusarium oxysporum</i>	Πάπυρος	2.3	Ismail et al., 2007
<i>Paecilomyces variotii</i>	Άξονας σπάδικα αραβόσιτου	0.12	Παρούσα εργασία

Μεγαλύτερες ενεργότητες παρουσίασαν ο *Aspergillus phoenicis*, 4.0 Units/ml, σε πίτυρο σίτου (Jager et al., 2001), ο *Aspergillus niger* NRRL 3112, 10.8 Units/ml, σε πίτυρο σίτου και γλυκερόλη (Abdella et al., 2016) και από τον *Aspergillus wentii*, 10.0 Units/ml, με πηγή άνθρακα κυτταρίνη (Srivastava et al., 1981).

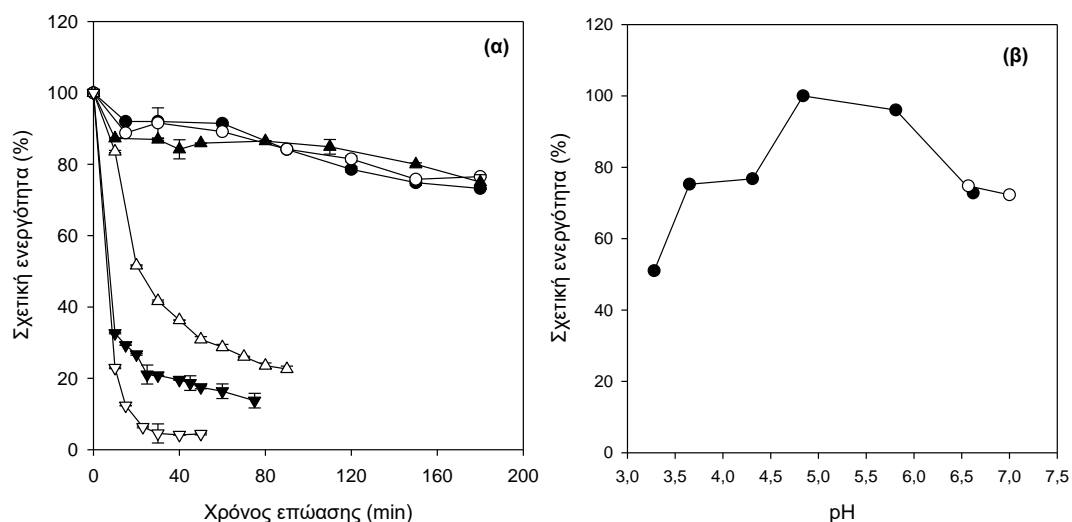
2. Χαρακτηριστικά ακατέργαστου ενζυμικού σκευάσματος

Η επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στην δράση της β-γλυκοζιδάσης του ακατέργαστου ενζυμικού εκχυλίσματος μελετήθηκε για εύρος θερμοκρασιών 30 έως 80 °C και εύρος pH 2.5-6.0. Παρατηρείται ότι στο ακατέργαστο ενζυμικό εκχύλισμα η β-γλυκοζιδάση έχει βέλτιστη θερμοκρασία δράσης 50 °C και βέλτιστο pH 4.0 (Διάγραμμα 7).



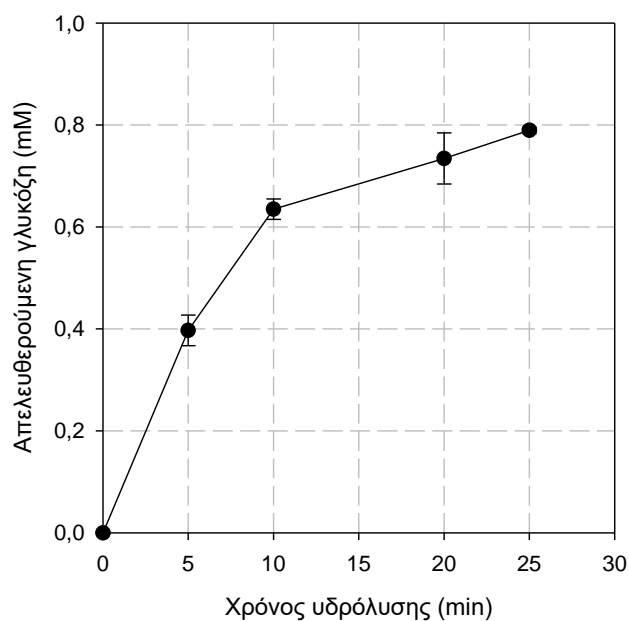
Διάγραμμα 7. Επίδραση (α) της θερμοκρασίας και (β) του pH στην δραστηριότητα της β-γλυκοζιδάσης στο ακατέργαστο ενζυμικό εκχύλισμα του μύκητα *P. variotii*.

Από το Διάγραμμα 8 παρατηρείται ότι στο ακατέργαστο ενζυμικό εκχύλισμα το ένζυμο απενεργοποιείται στους 80 °C σε χρόνο 50 λεπτών και στους 70 και 60 °C σε χρόνο περίπου 80 λεπτών η ενεργότητα μειώνεται στο 15 και 20 % της αρχικής, αντίστοιχα. Στους 50, 40 και 30 °C το ένζυμο παραμένει σταθερό με μείωση της αρχικής ενεργότητας στο 75 %.



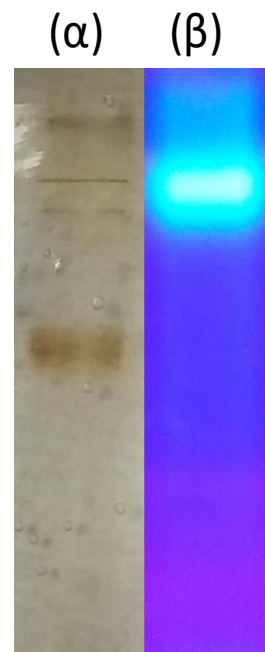
Διάγραμμα 8. (α) Θερμική απενεργοποίηση του ακατέργαστου ενζυμικού εκχύλισματος του μύκητα *P. variotii*. Σύμβολα: (●) 30°C, (○) 40°C, (▲) 50°C, (△) 60°C, (▼) 70°C και (▽) 80°C. (β) σταθερότητα του ακατέργαστου ενζυμικού εκχύλισματος του μύκητα *Paecilomyces variotii* σε διάφορα pH. Η επώαση έγινε για 24 ώρες στους 4°C. Σύμβολα: (●) ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών, (○) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

Στο Διάγραμμα 9 παρουσιάζεται η υδρόλυση της κελλοβιόζης από το ακατέργαστο ενζυμικό εκχύλισμα.



Διάγραμμα 9. Υδρόλυση κελλοβιόζης ακατέργαστο ενζυμικό εκχύλισμα του μύκητα *P. variotii*.

Το MUG (4-Methylumbelliferyl β-D-glucopyranoside) είναι ένα φθορίζον υπόστρωμα για την απεικόνιση της β-γλυκοζιδάσης σε μήτρα πηκτής. Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του ακατέργαστου ενζυμικού εκχυλίσματος υπό φυσικές συνθήκες (Native-PAGE). Ακολούθως το πήκτωμα επώαστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία MUG. Η εμφάνιση φθορίζουσας λουρίδας υπό υπεριώδες φως (UV) υποδηλώνει την απελευθέρωση της μεθυλουμπελλιφερόνης λόγω της δράσης της β-γλυκοζιδάσης (Εικόνα 3).



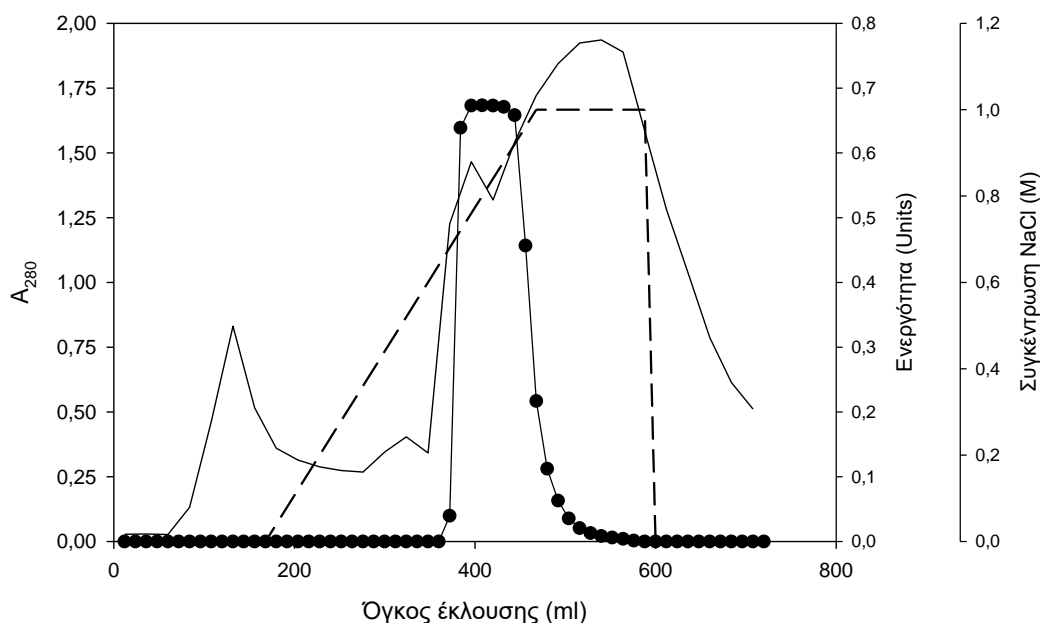
Εικόνα 3. Ηλεκτροφόρηση του ακατέργαστου ενζυμικού εκχυλίσματος υπό φυσικές συνθήκες (Native-PAGE) (α) χρώση με νιτρικό άργυρο και (β) επώαση με MUG.

3. Απομόνωση β-γλυκοζιδάσης

Μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο, στο ίζημα προστέθηκαν 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος πυπεραζίνης 20 mM (pH 7.0). Μετά την αφαλάτωση σε σάκους διαπίδυσης ο όγκος του διαλύματος των ενζύμων ήταν 50 mL.

3.1 Χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής

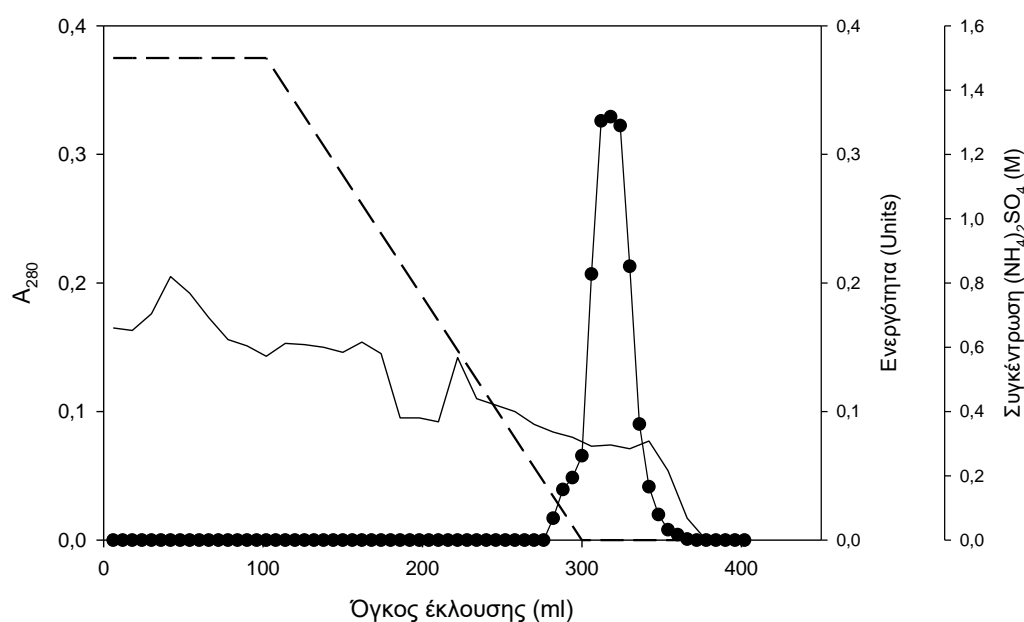
Το διάλυμα εισήχθει σε ανιοντική ρητίνη Q-Sepharose διαστάσεων 2.8×19.3 cm η οποία είχε εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα πυπεραζίνης 20 mM (pH 7.0). Η στήλη εκπλύθηκε με 150 mL του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος και οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν με γραμμική διαβάθμιση NaCl από 0 σε 100 mM στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα σε 300 mL του ρυθμιστικού διαλύματος. Η ροή ήταν 4 mL/min και ο όγκος των κλασμάτων ήταν 12 mL. Όλα τα κλάσματα έκλουσης ελέγχθηκαν για ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης. Τα κλάσματα 31-42 ελήφθησαν για συγκέντρωση NaCl 0.65 M όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 10. Τα κλάσματα αφού συγκεντρώθηκαν και αναμίχθηκαν συμπυκνώθηκαν σε όγκο 10 mL με την χρήση της συσκευής amicon με φίλτρο 30 kDa και με Centricut W-10 σε όγκο 2 mL.



Διάγραμμα 10. Χρωματογραφικός διαχωρισμός β-γλυκοζιδάσης του μύκητα *P. variotii* σε στήλη Q Sepharose. Σύμβολα: η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην απορρόφηση A₂₈₀, (---) βαθμίδωση άλατος NaCl και (●) ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης

3.2 Χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων

Το συμπυκνωμένο διάλυμα των ενζύμων μετά από εξισορρόπηση του pH σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM (pH 7.0) που εμπεριείχε θειικό αμμώνιο 1.5 M, εισήχθη σε στήλη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων HiPrep 16/10 Butyl FF, διαστάσεων 1.6×10 cm, η οποία είχε εξισορροπηθεί με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά από έκπλυση της στήλης με 100 mL του διαλύματος φωσφορικών η έκλουση πραγματοποιήθηκε με γραμμική βαθμίδωση από 1.5 M σε 0 M θειικού αμμωνίου σε 200 mL του διαλύματος. Η ροή ήταν 2 mL/min και ο όγκος των κλασμάτων ήταν 6 mL. Όλα τα κλάσματα έκλουσης ελέγχθηκαν για ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης. Τα κλάσματα 47-58 ελήφθησαν για συγκέντρωση (NH₄)₂SO₄ 0.18 M όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 11.



Διάγραμμα 11. Χρωματογραφικός διαχωρισμός β-γλυκοζιδάσης του μύκητα *P. variotii* σε στήλη t-Butyl. Σύμβολα: η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην απορρόφηση A_{280} , (---) βαθμίδωση $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και (●) ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης

Ακολουθεί το πρωτόκολλο καθαρισμού του ενζύμου β-γλυκοζιδάσης του μύκητα *P. variotii* (Πίνακας 5).

Η διαδικασία καθαρισμού είχε ως αποτέλεσμα την ανάκτηση του 25.3% της β-γλυκοζιδάσης από τον *P. variotii*. Οι Liu et al. (2012) απομόνωσαν μια β-γλυκοζιδάση από το *Aspergillus fumigatus* Z5 μετά από τέσσερα στάδια καθαρισμού με τελική ανάκτηση 9.5%.

Πίνακας 5. Πίνακας καθαρισμού του ενζύμου β-γλυκοζιδάση

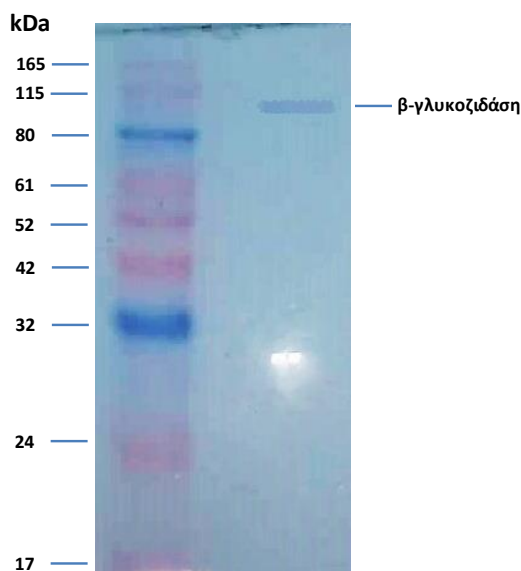
Βήμα καθαρισμού	Ολική ενεργότητα (Units)	Ολική πρωτεΐνη (mg)	Ειδική ενεργότητα (U/mg)	Ανάκτηση (%)	Καθαρισμός (φορές)
Ενζυμικό εκχύλισμα	100.3	198.0	0.5	100.0	1.0
Καταβύθιση με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	53.2	21.0	2.5	53.0	5.0
Q Sepharose	42.3	6.0	7.0	42.2	13.9
t-Butyl	25.4	4.5	5.6	25.3	11.1

Η β-γλυκοζιδάση που παράχθηκε από το από το *Penicillium pinophilum* καθαρίστηκε με τελική απόδοση 12.3% μετά από τρία στάδια καθαρισμού (Joo et al., 2010). Οι Kaur et al. (2007) απομόνωσαν μία β-γλυκοζιδάση από το *Melanocarpus* sp. εφαρμόζοντας τρία στάδια καθαρισμού με τελική απόδοση 15.89%. Οι Irshad et al. (2013) εφάρμοσαν μία διαδικασία τριών σταδίων για την απομόνωση της β-γλυκοζιδάσης που παράγεται από τον μύκητα *Trichoderma viride* και ανέκτησαν το 8.1% της ενεργότητας του ενζύμου. Σε γενικές γραμμές, η αύξηση των σταδίων καθαρισμού μειώνει την απόδοση του καθαρισμού, αυξάνοντας έτσι το κόστος του ενζύμου, γεγονός που καθιστά οικονομικά ασύμφορη την εφαρμογή του καθαρού ενζύμου σε βιομηχανικές διεργασίες.

4. Χαρακτηρισμός β-γλυκοζιδάσης

4.1 Προσδιορισμός μοριακού βάρους β-γλυκοζιδάσης

Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του απομονωθέντος ενζύμου πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Η χρώση της πηκτής έγινε με Coomassie Brilliant Blue. Το μοριακό βάρος της β-γλυκοζιδάσης βρέθηκε ίσο με 110 kDa (Εικόνα 4).

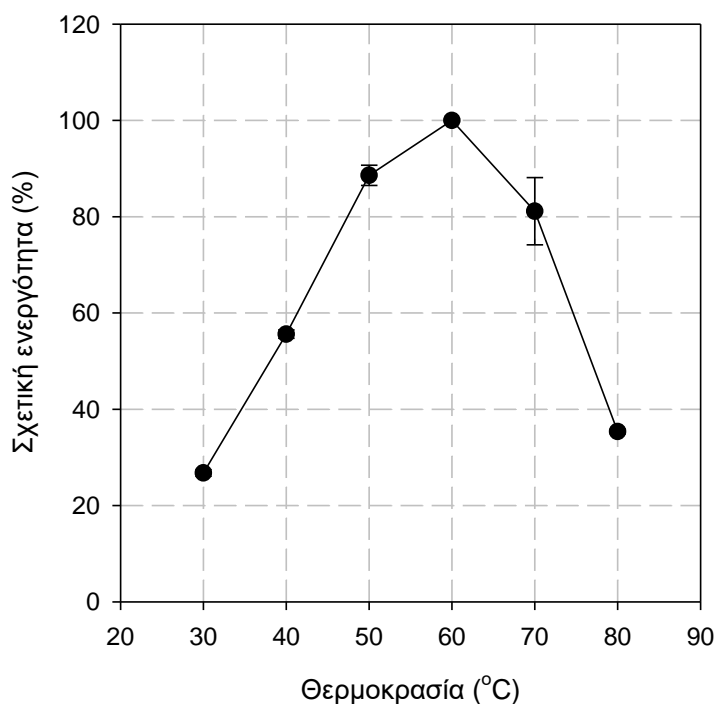


Εικόνα 4. SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση β-γλυκοζιδάσης. Στο πήκτωμα φαίνεται στα αριστερά η δέσμη των πρωτεϊνικών μορίων του πρότυπου διαλύματος (marker) και στα δεξιά η ζώνη που αντιστοιχεί στην β-γλυκοζιδάση

Το μοριακό της β-γλυκοζιδάσης του *P. variotti* βρίσκεται στο εύρος των μοριακών βαρών μυκητιακής προέλευσης β-γλυκοζιδασών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Η β-γλυκοζιδάση του μύκητα *T. citrinoviride* έχει επίσης μοριακό βέρος 110 kDa, του μύκητα *Paecilomyces bainier* έχει 115 kDa και των μυκήτων *P. decumbens*, *A. niger* NII-08121, *P. funiculosum* και *Penicillium janthinellum* έχουν 120 kDa (Πίνακας 2).

4.2 Βέλτιστη θερμοκρασίας και βέλτιστο pH δράσης της β-γλυκοζιδάσης

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην δράση της β-γλυκοζιδάσης μελετήθηκε για εύρος θερμοκρασιών 30 έως 80 °C. Η βέλτιστη θερμοκρασία βρέθηκε ίση με 60 °C (Διάγραμμα 12).

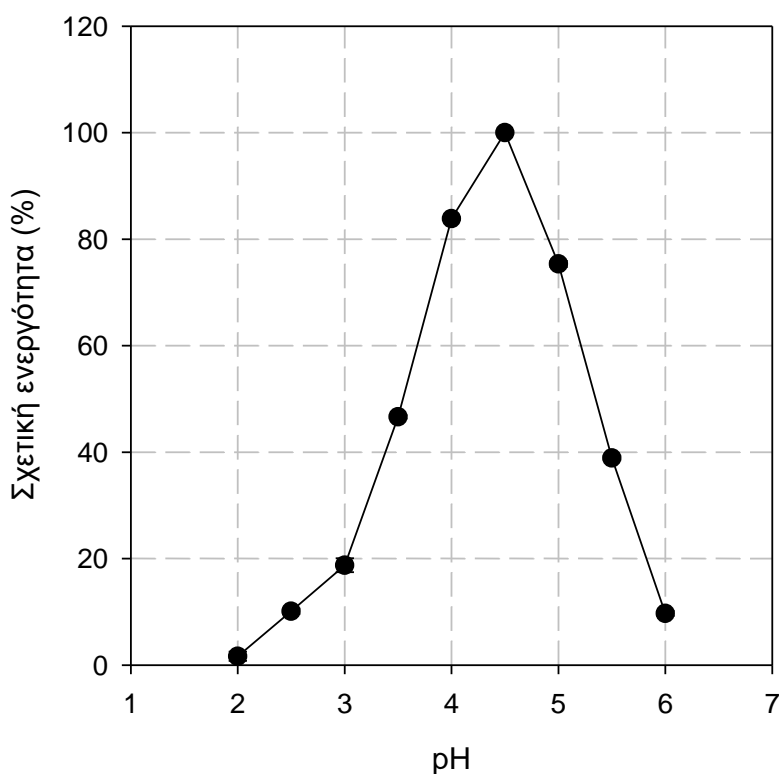


Διάγραμμα 12. Επίδραση της θερμοκρασίας στην δραστηριότητα της β-γλυκοζιδάσης του μύκητα *P. variotti*.

Οι β-γλυκοζιδάσες μυκητιακής προέλευσης εμφανίζουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης μεταξύ 40 και 80 °C (Ahmed et al., 2017). Για παράδειγμα οι β-γλυκοζιδάσες από *Lichtheimia corymbifera* και *Byssosclamyces spectabilis* έχουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης 55°C και 50°C αντίστοιχα (de Moraes et al., 2018) ενώ η β-γλυκοζιδάση του *Thermoascus auranticus* εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία ίση με 80 °C (Parry et al., 2001). β-γλυκοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη

του γένους *Aspergillus* (π.χ. *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*,) εμφανίζουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στο εύρος 50-70 °C (Gong et al., 2014, Nagayoshi, et al., 2011, Riou et al., 1998, Liu et al., 2012) ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της β-γλυκοζιδάσης από το μύκητα *Paecilomyces bainier* βρέθηκε ίση με 60 °C (Yan et al., 2008).

Το βέλτιστο pH δράσης της β-γλυκοζιδάσης βρέθηκε ίσο με 4.5 (Διάγραμμα 13). Οι β-γλυκοζιδάσες μυκητιακής προέλευσης εμφανίζουν βέλτιστο pH δράσης μεταξύ 4.0 και 6.0 (Ahmed et al., 2017).

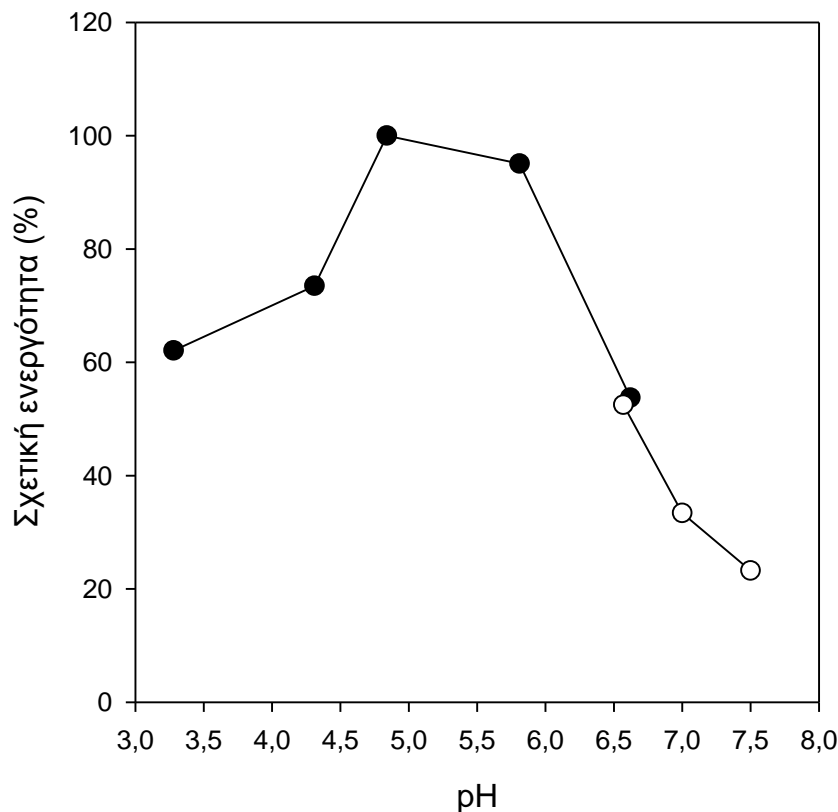


Διάγραμμα 13. Επίδραση του pH στην δραστηριότητα της β-γλυκοζιδάσης του μύκητα *P. variotii*.

β-γλυκοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη του γένους *Aspergillus* (π.χ. *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*,) εμφανίζουν βέλτιστο pH δράσης στο εύρος 4.0-6.0 (Gong et al., 2014, Nagayoshi, et al., 2011, Riou et al., 1998, Liu et al., 2012). Το βέλτιστο pH δράσης β-γλυκοζιδάσων από *L. corymbifera*, *B. spectabilis*, *T. auranticus* και *P. bainier* βρέθηκε ίσο με 4.5, 4.0, 4.5 και 3.5 αντίστοιχα (de Morais et al., 2018, Parry et al., 2001, Yan et al., 2008).

5. Σταθερότητα β-γλυκοζιδάσης σε διάφορες τιμές pH

Η β-γλυκοζιδάση που παράχθηκε από τον *P. variotti* βρέθηκε ότι ήταν σταθερή μετά από επώαση για 24 ώρες στους 4 °C σε pH 4.5-6.0 (Διάγραμμα 14).



Διάγραμμα 14. Σταθερότητα β-γλυκοζιδάσης σε διάφορα pH. Η επώαση έγινε για 24 ώρες στους 4°C. Σύμβολα: (●) ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών, (○) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

β-γλυκοζιδάσες που χουν απομονωθεί από τους μύκητες *L. corymbifera* και *B. Spectabilis* είναι σταθερές σε ένα εύρος pH 4.0-7.0 και 4.0-6.0, αντίστοιχα (de Morais et al., 2018). Άλλες β-γλυκοζιδάσες που έχουν χαρακτηριστεί από τον *P. funiculosum* NCL1 εμφανίζουν σταθερότητα σε pH 3.0-6.0 (Ramani et al., 2012) και από τον *A. oryzae* 4.5-10.0, 6.0-9.0 και 4.0-7.0 (Kudo et al., 2015).

6. Θερμική σταθερότητα της β-γλυκοζιδάσης

Η απενεργοποίηση ενός ενζύμου μπορεί να περιγραφεί με κινητική πρώτης τάξης, η ενζυμική δραστηριότητα μειώνεται γραμμικά συναρτήσει του χρόνου όπως περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = -k_d \cdot t \quad (\text{Εξ. 1})$$

όπου A_t (Units/ mg πρωτεΐνης) είναι η ενεργότητα του ενζύμου στο χρόνο t , A_0 (Units/ mg πρωτεΐνης) είναι η αρχική ενεργότητα του ενζύμου, t (min) είναι ο χρόνος επώασης και k_d (min^{-1}) είναι η σταθερά της ταχύτητας απενεργοποίησης.

Από την κλίση της γραφικής παράστασης του $\ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right)$ με το χρόνο, για κάθε θερμοκρασία που εξετάσθηκε, υπολογίζεται η σταθερά της ταχύτητας απενεργοποίησης k_d (min^{-1}) του ενζύμου. Ο χρόνος ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) ενός ενζύμου, σε δεδομένη θερμοκρασία, είναι ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση της ενεργότητας του στο ήμισυ της αρχικής και υπολογίζεται από την Εξ. 10 (Gouzi *et al.*, 2011; Olusesan *et al.*, 2011; Bhosale *et al.*, 2016).

$$t_{1/2} = \frac{0.6931}{k_d} \quad (\text{Εξ. 2})$$

όπου $t_{1/2}$ (min) ο χρόνος ημιζωής και k_d , (min^{-1}) η σταθερά απενεργοποίησης της β-γλυκοζιδάσης.

Ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού D (Decimal reduction time, D-value) ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται σε δεδομένη θερμοκρασία προκειμένου να μειωθεί κατά 90% η αρχική ενεργότητα του ενζύμου και υπολογίζεται από την Εξ. 3 (Gouzi *et al.*, 2011; Olusesan *et al.*, 2011; Bhosale *et al.*, 2016).

$$D = \frac{2.303}{k_d} \quad (\text{Εξ. 3})$$

όπου D (min) ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού και k_d , (min^{-1}) η σταθερά απενεργοποίησης της β-γλυκοζιδάσης.

Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης της β-γλυκοζιδάσης (E , kJ/mol) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση του Arrhenius (Εξ. 4, 5) (Gouzi *et al.*, 2011; Olusesan *et al.*, 2011; Bhosale *et al.*, 2016).

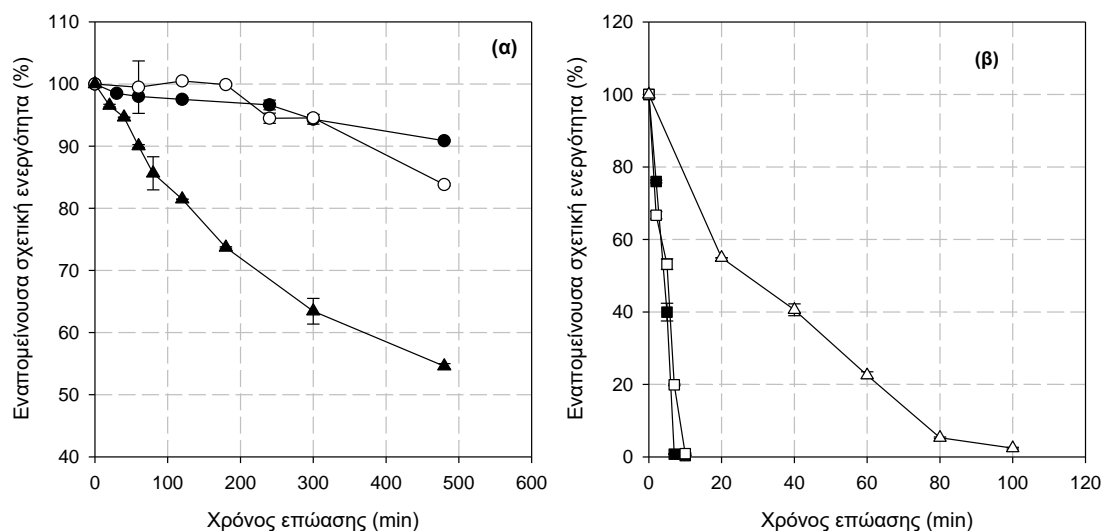
$$k_d = k_0 \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) \quad (\text{Εξ. 4})$$

ή

$$\ln(k_d) = \ln(k_0) - \left(\frac{E}{R}\right) \frac{1}{T} \quad (\text{Εξ. 5})$$

όπου k_d , (min^{-1}) η σταθερά θερμικής απενεργοποίησης της β-γλυκοζιδάσης, k_0 η σταθερά του παράγοντα συχνότητας ή παράγοντας Arrhenius, E (J/mol), η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων ($8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T η απόλυτη θερμοκρασία (K).

Στο Διάγραμμα 15 παρουσιάζεται η εναπομείνουσα ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης συναρτήσει του χρόνου επώασης σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60, 70 και 80 °C min. Παρατηρείται ότι το ένζυμο απενεργοποιείται πλήρως σε χρόνο 10 λεπτών στους 70 και 80 °C και σε χρόνο περίπου 1.5 ώρας στους 60 °C. Στους 50°C είναι σχετικά σταθερό καθώς διατηρεί το 55% της αρχικής του ενεργότητας σε διάστημα 8 ωρών και στους 40 και 30 °C είναι σταθερό με διατήρηση του 85 και 90% της αρχικής ενεργότητας, αντίστοιχα στο ίδιο χρονικό διάστημα.

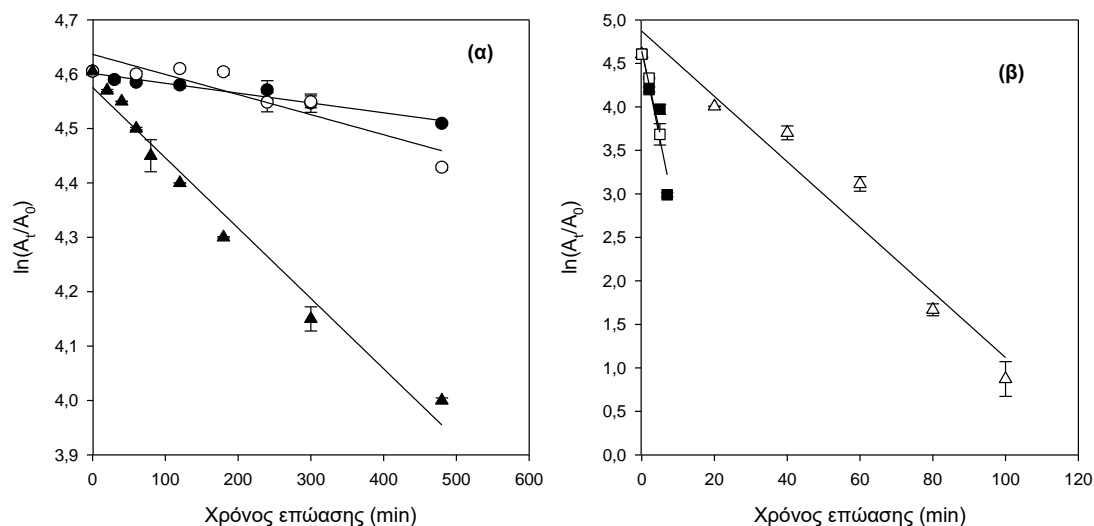


Διάγραμμα 15. Υπολογισμός σταθερών ταχύτητας απενεργοποίησης σε θερμοκρασίες (α) (●) 30°C, (○) 40°C, (▲) 50°C και (β) (△) 60°C, (■) 70°C, (□) 80°C.

Οι β-γλυκοζιδάσες από τους μύκητες *L. corymbifera* και *B. spectabilis* εμφανίζουν σταθερότητα σε θερμοκρασίες μέχρι 40 και 50 °C αντίστοιχα (de Moraes et al., 2018). Η β-γλυκοζιδάση του *P. funiculosum* NCL1 παρουσιάζει σταθερότητα μέχρι τους 60

°C (Ramani et al., 2012) και του *A. oryzae* σε θερμοκρασίες κάτω από 50 °C (Kudo et al., 2015).

Στο Διάγραμμα 16 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση του $\ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right)$ με το χρόνο, για κάθε θερμοκρασία που εξετάστηκε από το υπολογίζεται η σταθερά της ταχύτητας απενεργοποίησης k_d (min^{-1}) του ενζύμου (Πίνακας 6).



Διάγραμμα 16. Υπολογισμός σταθερών ταχύτητας απενεργοποίησης σε θερμοκρασίες (α) (●) 30°C, (○) 40°C, (▲) 50°C και (β) (△) 60°C, (■) 70°C, (□) 80°C.

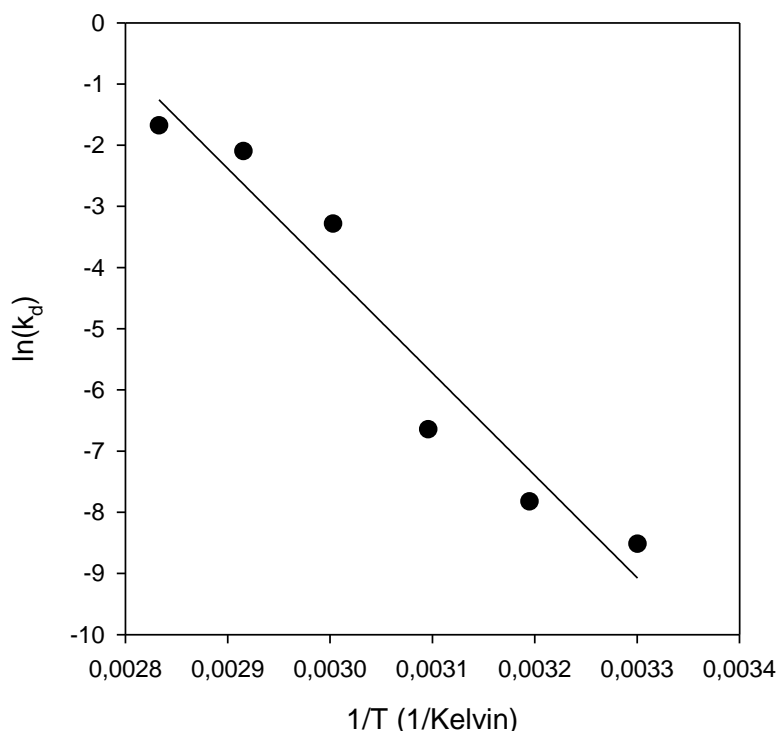
Πίνακας 6. Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης β-γλυκοζιδάσης

Θερμοκρασία (°C)	k_d (min^{-1})
30	2.00×10^{-4}
40	4.00×10^{-4}
50	1.30×10^{-3}
60	3.75×10^{-2}
70	1.23×10^{-1}
80	1.87×10^{-1}

Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση των σταθερών θερμικής απενεργοποίησης (k_d) (Πίνακας 6), γεγονός που υποδεικνύει ταχύτερη απενεργοποίηση σε θερμοκρασίες άνω των 60°C.

Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης είναι η ενέργεια που απαιτείται προκειμένου να αλλάξει η διαμόρφωση του ενζύμου (Leite et al., 2007). Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης της β-γλυκοζιδάσης (E , kJ/mol) υπολογίστηκε σύμφωνα

με την εξίσωση του Arrhenius (Εξ. 5) (Διάγραμμα 17) και βρέθηκε ίση με 139.02 kJ.mol⁻¹.



Διάγραμμα 17. Υπολογισμός ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης (εξίσωση Arrhenius)

Οι ενέργειες θερμικής απενεργοποίησης των β-γλυκοζιδασών που απομονώθηκαν από τους μύκητες *T. aurantiacus*, *A. pullulans* και *A. niger* βρέθηκαν ίσες με 414 kJ.mol⁻¹, 537 kJ.mol⁻¹ και 388.6 kJ.mol⁻¹ αντίστοιχα, ενώ η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης μιας εμπορικής β-γλυκοζιδάσης από αμύγδαλα βρέθηκε ίση με 187.4 kJ.mol⁻¹ (Leite et al., 2007; Rashid and Siddiqui, 1998; Chang et al., 2008). Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης β-γλυκοζιδασών που απομονώθηκαν από τα βακτήρια *Bacillus* sp. SJ-10 και *Cellulomonas biazotea* βρέθηκαν ίσες με 729.52 kJ.mol⁻¹ και 88 kJ.mol⁻¹ αντίστοιχα (Lee et al., 2015; Rajoka et al., 2004). Επίσης ενέργειες θερμικής απενεργοποίησης ίσες με 89.9 kJ.mol⁻¹ και 246.7 kJ.mol⁻¹ βρέθηκαν για τις β-γλυκοζιδάσες των μικροοργανισμών *L. corymbifera* και *B. spectabilis* αντίστοιχα (de Moraes et al. 2018). Όσο υψηλότερη είναι η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης τόσο σταθερότερη είναι η δομή του ενζύμου (Leite et al., 2007).

Οι τιμές του χρόνου ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) και του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value) παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Χρόνοι ημίσειας ζωής, χρόνοι υποδεκαπλασιασμού της β-γλυκοζιδάσης

T (°C)	t _{1/2} (min)	D (min)
30	3465.5	11515.0
40	1732.8	5757.5
50	5332	1771.5
60	18.5	61.4
70	5.7	18.8
80	3.7	12.3

Οι χρόνοι ημίσειας ζωής του ενζύμου στους 70 και 80°C υπολογίσθηκαν ίσοι με 5.7 και 3.7 min, αντίστοιχα, ενώ στους 50°C και 60°C βρέθηκαν ίσοι με 8.9 ώρες και 18.5 min αντίστοιχα. Οι τιμές των χρόνων υποδεκαπλασιασμού (D-value) στους 70 και 80°C (Πίνακας 7) έδειξαν ότι προκειμένου να μειωθεί η αρχική ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης κατά 90% απαιτούνται 18.8 και 12.3 min, αντίστοιχα.

Οι χρόνοι ημίσειας ζωής μιας εσωκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης από το βακτήριο *C. biazotea* σε θερμοκρασίες 55 °C και 60°C βρέθηκαν ίσοι με 8 και 4 h αντίστοιχα, ενώ της εξωκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης από το μύκητα *A. niger* στους 55°C και 60°C βρέθηκαν ίσοι με 1925 min (32 h) και 408 min (6.8 h) αντίστοιχα (Rajoka et al., 2004; Rashid and Siddiqui, 1998). Χρόνοι ημίσειας ζωής ίσοι με 44.9 min και 13.4 min στους 55°C και 60°C αντίστοιχα, βρέθηκαν για την εμπορική β-γλυκοζιδάσης από αμύγδαλα (Chang et al., 2008). Τέλος οι de Moraes et al., (2018) αναφέρουν ότι οι χρόνοι ημίσειας ζωής των β-γλυκοζιδασών από *L. corymbifera* και *B. spectabilis* σε θερμοκρασία 50°C βρέθηκαν ίσοι με 16.6 min και 94.9 min, αντίστοιχα.

Με τη βοήθεια των υπολογισθέντων τιμών της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης (E) και των σταθερών θερμικής απενεργοποίησης (k_d) υπολογίσθηκαν οι μεταβολές των θερμοδυναμικών μεγεθών, ενθαλπία (ΔH*), εντροπία (ΔS*) και ελεύθερη ενέργεια Gibbs (ΔG*). Ειδικότερα η μεταβολή της ενθαλπίας (ΔH*) και της ελεύθερης ενέργειας απενεργοποίησης (ΔG*) για κάθε θερμοκρασία επώασης της β-γλυκοζιδάσης υπολογίστηκαν σύμφωνα με τις εξισώσεις 6 και 7 αντίστοιχα (Gouzi et al., 2011; Olusesan et al., 2011; Bhosale et al., 2016).

$$\Delta H^* = E - R \cdot T \quad (\text{Εξ. 6})$$

όπου ΔH^* η μεταβολή της ενθαλπίας ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), E η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), R η παγκόσμια σταθερά των αερίων ($8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T η απόλυτη θερμοκρασία (K).

$$\Delta G^* = -R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{k_d \cdot h}{k \cdot T}\right) \quad (\text{Εξ. 7})$$

όπου ΔG^* η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας απενεργοποίησης ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), k_d σταθερά απενεργοποίησης της β-γλυκοζιδάσης (min^{-1}), T η απόλυτη θερμοκρασία (K), R η παγκόσμια σταθερά των αερίων ($8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), h η σταθερά Plank ($1.104 \times 10^{-35} \text{ J}\cdot\text{min}$), k η σταθερά Boltzmann ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$).

Τέλος η μεταβολή της εντροπίας ΔS^* εκτιμήθηκε από την εξίσωση 8 (Gouzi *et al.*, 2011; Olusesan *et al.*, 2011; Bhosale *et al.*, 2016).

$$\Delta S^* = \frac{(\Delta H^* - \Delta G^*)}{T} \quad (\text{Εξ. 8})$$

όπου ΔS^* είναι η μεταβολή της εντροπίας ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), ΔH^* η μεταβολή της ενθαλπίας ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), ΔG^* η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας απενεργοποίησης ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), T η απόλυτη θερμοκρασία (K).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 8). Ο υπολογισμός των θερμοδυναμικών παραμέτρων απενεργοποίησης παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου. Η σταθερότητα ενός πρωτεϊνικού μορίου είναι αποτέλεσμα ισορροπίας μεταξύ σταθεροποιητικών και αποσταθεροποιητικών τάσεων οι οποίες επηρεάζονται από υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου και δισουλφιδικούς δεσμούς και τον βαθμό αναδίπλωσης του μορίου (Gouzi *et al.*, 2011; de Castro *et al.*, 2015). Γενικά, η μεταβολή της ενθαλπίας (ΔH^*) σχετίζεται με τον αριθμό των μη ομοιοπολικών δεσμών που διασπώνται κατά τη διάρκεια της θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου (Ariahu *et al.*, 2000). Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της ΔH^* , τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μη ομοιοπολικών δεσμών που είναι παρόντα στο μόριο με αποτέλεσμα να είναι περισσότερο σταθερό (Gouzi *et al.*,

2011). Οι τιμές της ΔH^* σε εύρος θερμοκρασιών από 30 έως 80°C κυμάνθηκαν από 136.50 έως 136.08 kJ·mol⁻¹ (Πίνακας 7).

Πίνακας 8. Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης β-γλυκοζιδάσης.

T (°C)	ΔG^* (kJ·mol ⁻¹)	ΔS^* (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	ΔH^* (kJ·mol ⁻¹)
30	106.02	100.60	136.50
40	107.80	91.43	136.42
50	108.16	87.22	136.33
60	102.29	101.99	136.25
70	102.07	99.42	136.17
80	103.89	91.20	136.08

Οι τιμές της ΔH^* για τη θερμική απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης του μύκητα *A. niger* για εύρος θερμοκρασιών 55 έως 70°C ήταν υψηλότερες αυτών της παρούσας εργασίας και κυμάνθηκαν από 385.87 έως 385.75 kJ·mol⁻¹ (Rashid and Siddiqui, 1998). Η μεταβολή της ΔH^* κατά τη θερμική απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης του θερμόφιλου μύκητα *T. aurantiacus* για εύρος θερμοκρασιών 80°C έως 87.5°C βρέθηκε 411.46-411.40 kJ·mol⁻¹ ενώ για το ίδιο εύρος θερμοκρασιών η β-γλυκοζιδάση του μεσόφιλου μύκητα *A. pullulans* βρέθηκαν 534.12-534.06 kJ·mol⁻¹ (Leite et al., 2007). Η μεταβολή της ΔH^* κατά τη θερμική απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης του *Bacillus* sp. SJ-10 για εύρος θερμοκρασιών 40-50°C κυμάνθηκε από 726.94 έως 726.84 kJ·mol⁻¹ (Lee et al., 2015). Οι Rajoka et al., (2004) μελετώντας τη θερμική απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης του *Cellulomonas biazotea* αναφέρουν ότι οι τιμές της ΔH^* σε εύρος θερμοκρασιών από 40 έως 60°C κυμάνθηκαν από 65.4 έως 65.3 kJ·mol⁻¹.

Η εντροπία αποτελεί την μεταβολή της δομικής διαταραχής (structural disorder) κατά την αναδίπλωση του ενζύμου, ενώ υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ των ΔH^* και ΔS^* ως προς τη σταθερότητα του ενζύμου (Olusesan et al., 2011). Οι υψηλές τιμές του ΔH^* συνδέονται με την αυξημένη σταθερότητα των ενζύμων εκτός εάν συνδυάζονται παράλληλα και με μια μεγάλη αύξηση της τιμής του ΔS^* , η οποία λειτουργεί αποσταθεροποιητικά. Η σταθερότητα ενός ενζύμου ενισχύεται όταν τα

επίπεδα των τιμών ΔH^* είναι υψηλά και τα επίπεδα των τιμών ΔS^* είναι χαμηλά και παράλληλα όσο υψηλότερη είναι η τιμή ΔS^* , τόσο μικρότερη είναι η θερμική σταθερότητα της πρωτεΐνης (Ariahu *et al.*, 2000; Olusesan *et al.*, 2011).

Οι τιμές της ΔS^* που υπολογίστηκαν για κάθε θερμοκρασία ήταν θετικές (Πίνακας 7) γεγονός που υποδεικνύει δεν υπάρχουν διαδικασίες συσσωμάτωσης, γιατί αν συνέβαινε αυτό οι τιμές θα ήταν αρνητικές (Ortega *et al.*, 2004), όπως στην περίπτωση της β-γλυκοζιδάσης του *C. biazotea* (Rajoka *et al.*, 2004) (οι τιμές της ΔS^* κυμάνθηκαν από -141 έως -132 J·mol⁻¹·K⁻¹). Επιπλέον οι υπολογισθείσες τιμές δεν εμφανίζουν κάποια συγκεκριμένη τάση (Πίνακας 8). Παρόμοια διακύμανση εμφάνισαν οι τιμές της ΔS^* κατά τη θερμική απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης του μύκητα *A. niger* (Rashid and Siddiqui, 1998) καθώς και της β-γλυκοζιδάσης του *Bacillus* sp. SJ-10 (Lee *et al.*, 2015). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ειδικά για την β-γλυκοζιδάση του *Bacillus* sp. SJ-10 η μέση τιμή της ΔS^* ήταν αρκετά υψηλή (2103.25 J·mol⁻¹·K⁻¹). Αντίθετα οι τιμές της ΔS^* εμφάνισαν σταθερότητα σε όλο το εύρος των εξετασθέντων θερμοκρασιών που μελετήθηκαν για την απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης του θερμοφίλου μύκητα *T. aurantiacus* (περίπου 888.32 J·mol⁻¹·K⁻¹) καθώς και της β-γλυκοζιδάσης του μεσόφλου μύκητα *A. pullulans* (περίπου 1225.17 J·mol⁻¹·K⁻¹) (Leite *et al.*, 2007).

Η τιμή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG^*) σχετίζεται άμεσα με την σταθερότητα της πρωτεΐνης. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της ΔG^* , τόσο μεγαλύτερη είναι και η σταθερότητα του ενζύμου. Οι τιμές της ΔG^* παρουσίασαν μία ελαφρά αύξηση αυξανόμενης της θερμοκρασίας έως τους 50°C, ακολουθούμενη από μείωση με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας (Πίνακας 8). Παρόμοια διακύμανση στις τιμές της ΔG^* αναφέρθηκε από τους Rajoka *et al.*, (2004) κατά τη μελέτη της θερμικής απενεργοποίησης της β-γλυκοζιδάσης του *C. biazotea*. Η μεταβολή της ΔG^* κατά τη θερμική απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης παρουσίασε μείωση με αύξηση της θερμοκρασίας για τα ένζυμα των *Bacillus* sp. SJ-10, (από 69.07 kJ·mol⁻¹ στους 40°C σε 47.92 kJ·mol⁻¹ στους 50 °C) (Lee *et al.*, 2015), *A. niger* (από 113.38 kJ·mol⁻¹ στους 55°C σε 102.12 kJ·mol⁻¹ στους 70°C) (Rashid and Siddiqui, 1998), *T. aurantiacus* (από 97.76 kJ·mol⁻¹ στους 80 °C σε 91.3 kJ·mol⁻¹ στους 87.5°C), *A. pullulans* (από 101.63 kJ·mol⁻¹ στους 80°C σε 92.38 kJ·mol⁻¹ στους 87.5°C) (Leite *et al.*, 2007).

6. Υπολογισμός κινητικών σταθερών

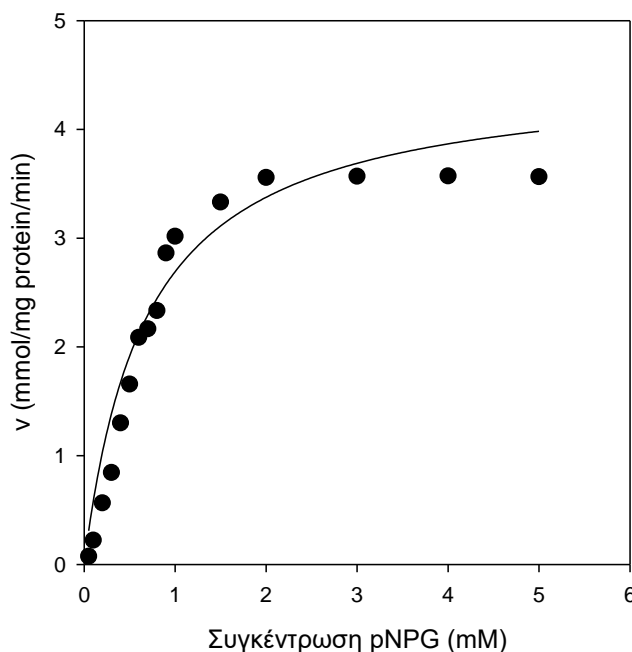
Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των κινητικών σταθερών K_m και V_{max} της β-γλυκοζιδάσης ήταν το pNPG και η κελλοβιόζη. Οι τιμές K_m και V_{max} για τα τρία υποστρώματα υπολογίστηκαν, με βάση την εξίσωση Michaelis-Menten (Εξ. 9).

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Εξ. 9})$$

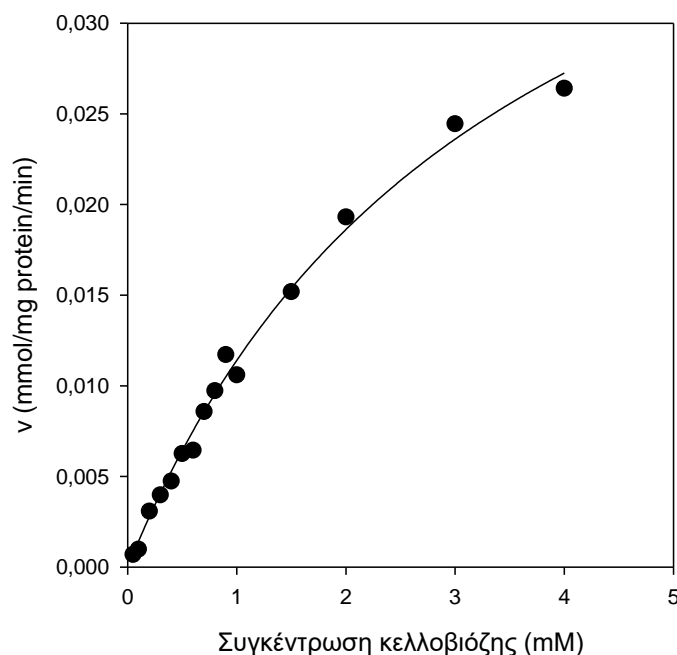
Όπου,

v η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης (mmoles απελευθερούμενου προϊόντος/mg πρωτεΐνης/min), v_{max} η μέγιστος ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης (mmoles απελευθερούμενου προϊόντος/mg πρωτεΐνης/min), $[S]$ η συγκέντρωση συγκέντρωση υποστρώματος (mM) και K_m σταθερά Michaelis-Menten (mM)

Η μεταβολή της ταχύτητας παραγωγής του προϊόντος συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος για καθένα από τα δύο υποστρώματα, παρουσιάζεται στα Διαγράμματα 18 και 19.



Διάγραμμα 18. Μεταβολή της ταχύτητας παραγωγής προϊόντος συναρτήσει της συγκέντρωσης του pNPG (διάγραμμα Michaelis-Menten).



Διάγραμμα 19. Μεταβολή της ταχύτητας παραγωγής προϊόντος συναρτήσει της συγκέντρωσης της κελλοβιόζης (διάγραμμα Michaelis-Menten).

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των κινητικών σταθερών (K_m και k_{cat}) καθώς και ο λόγος k_{cat}/K_m για τα δύο υποστρώματα.

Πίνακας 9. Κινητικές σταθερές της β-γλυκοζιδάσης

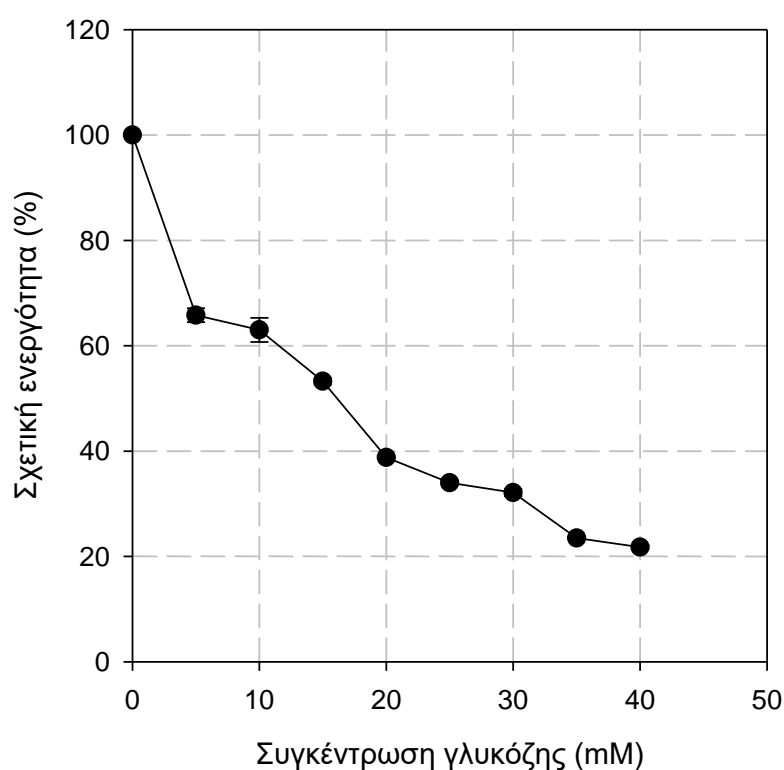
Υπόστρωμα	K_m (mM)	V_{max} (mmole/mg protein/min)	k_{cat} (sec ⁻¹)	k_{cat}/K_m
pNPG	0.68	4.52	8286.7	12186.3
Κελλοβιόζη	3.45	0.058	106.3	156.4

Η γλυκοζιδάση παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση στο pNPG σε σχέση με την κελλοβιόζη, όπως προκύπτει από το λόγος καταλυτικής αποδοτικότητας k_{cat}/K_m , ο οποίος είναι πολύ μεγαλύτερος στο pNPG (Πίνακας 9). Η β-γλυκοζιδάση από τον *Aspergillus niger* παρουσιάζει υψηλότερη τιμή K_m ίση με 3.11 mM (Zahoor et al., 2011) για την υδρόλυση του pNPG. Χαμηλότερες τιμές έχουν εμφανίσει οι β-γλυκοζιδάσες από τους μύκητες *Penicillium piceum* (Cel3E), 0.0019 mM (Gao et al., 2014), *Trichoderma reesei* (Cel3A), 0.14 mM (Chen et al., 1992) και *Penicillium decumbens* (Cel3A), 0.006 mM (Chen et al., 2010). Παρόμοια τιμή επιτεύχθηκε από

τους Vaheri et al. (1979) από τον *Aspergillus niger* (Cel3A) με τιμή K_m ίση με 0.57 mM.

7. Αναστολή από την γλυκόζη

Μελετήθηκε η επίδραση της γλυκόζης (προϊόν της υδρόλυσης της κελλοβιόζης) στην δραστικότητα της β-γλυκοζιδάσης. Στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε γλυκόζη σε συγκεντρώσεις από 5 mM έως 40 mM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 20.



Διάγραμμα 20. Επίδραση της γλυκόζης στην ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης.

Το ένζυμο παρεμποδίζεται ισχυρά από την γλυκόζη. Περίπου το 20% της αρχικής ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης ανακτάται παρουσία 40 mM γλυκόζης. Η πλειοψηφία των μικροβικών β-γλυκοζιδασών παρεμποδίζονται από την γλυκόζη, γεγονός που αποτελεί το σημαντικότερο πρόβλημα κατά την υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων. Η συσσώρευση γλυκόζης μειώνει σημαντικά το ρυθμό υδρόλυσης της κυτταρίνης. Η έκταση της παρεμπόδισης των διαφόρων β-γλυκοζιδασών από τη γλυκόζη ποικίλλει ακόμα και μεταξύ ενζύμων που

προέρχονται από το ίδιο μυκητιακό είδος (Sørensen et al., 2011). Οι β-γλυκοζιδάσες των μυκήτων *L. corymbifera* και *B. Spectabilis* εμφανίζουν περίπου το 50% των αρχικών ενεργοτήτων τους σε συγκέντρωση 50 και 30 mM γλυκόζης, αντίστοιχα (de Morais et al., 2018).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η απομόνωση και ο καθαρισμός του ενζύμου β-γλυκοζιδάση από το μύκητα *Paecilomyces variotti*.

Στο πρώτο κομμάτι της εργασίας η ανάπτυξη του *P. variotti* πραγματοποιήθηκε σε βυθισμένη καλλιέργεια χρησιμοποιώντας ως πηγές άνθρακα: άχυρο σίτου, άχυρο κριθαριού, άξονα σπάδικα αραβόσιτου, πίτυρο σίτου, αλκαλικά προκατεργασμένο άχυρο σίτου και αλκαλικά προκατεργασμένο άξονα σπάδικα αραβόσιτου. Η πηγή άνθρακα στην οποία επιτεύχθηκε η μέγιστη παραγωγή β-γλυκοζιδάσης ήταν ο άξονας σπάδικα αραβόσιτου σε συγκέντρωση 4% (β/ο). Η ενεργότητα που επιτεύχθηκε ήταν 0.12 Units/ml. Παρόμοιες τιμές ενεργοτήτων επιτεύχθηκαν από τους Bai et al. (2013) από τον μύκητα *Penicillium simplicissimum* σε υπόστρωμα που περιείχε πίτυρο σίτου, άχυρο ρυζιού και κέικ φασολιών (0.15 Units/ml) και από τους Lan et al. (2013) από τον μύκητα *Trichoderma viridi* με πηγή άνθρακα βαγάσση ζαχαροκάλαμου και πίτυρο σίτου (0.25 Units/ml). Μεγαλύτερες ενεργότητες παρουσίασαν ο *Aspergillus phoenicis*, 4.0 Units/ml, σε πίτυρο σίτου (Jager et al., 2001), ο *Aspergillus niger* NRRL 3112, 10.8 Units/ml, σε πίτυρο σίτου και γλυκερόλη (Abdella et al., 2016) και από τον *Aspergillus wentii*, 10.0 Units/ml, με πηγή άνθρακα κυτταρίνη (Srivastava et al., 1981).

Από τον καθαρισμό επιτεύχθηκε ανάκτηση 25.3% της αρχικής ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης μετά από δύο στάδια καθαρισμού. Οι Liu et al. (2012) απομόνωσαν μια β-γλυκοζιδάση από το *Aspergillus fumigatus* Z5 μετά από τέσσερα στάδια καθαρισμού με τελική ανάκτηση 9.5%. Η β-γλυκοζιδάση που παράχθηκε από το από το *Penicillium pinophilum* καθαρίστηκε με τελική απόδοση 12.3% μετά από τρία στάδια καθαρισμού (Joo et al., 2010). Οι Kaur et al. (2007) απομόνωσαν μία β-γλυκοζιδάση από το *Melanocarpus* sp. εφαρμόζοντας τρία στάδια καθαρισμού με τελική απόδοση 15.89%. Οι Irshad et al. (2013) εφάρμοσαν μία διαδικασία τριών σταδίων για την απομόνωση της β-γλυκοζιδάσης που παράγεται από τον μύκητα *Trichoderma viride* και ανέκτησαν το 8.1% της ενεργότητας του ενζύμου. Σε γενικές γραμμές, η αύξηση των σταδίων καθαρισμού μειώνει την απόδοση του καθαρισμού, αυξάνοντας έτσι το κόστος του ενζύμου, γεγονός που καθιστά οικονομικά ασύμφορη την εφαρμογή του καθαρού ενζύμου σε βιομηχανικές διεργασίες.

Κατά τον χαρακτηρισμό προσδιορίστηκε το μοριακό βάρος της β-γλυκοζιδάσης και βρέθηκε ίσο με 110 kDa, το οποίο βρίσκεται στο εύρος των μοριακών βαρών μυκητιακής προέλευσης β-γλυκοζιδασών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Η β-γλυκοζιδάση του μύκητα *T. citrinoviride* έχει επίσης μοριακό βάρος 110 kDa, του μύκητα *Paecilomyces bainier* έχει 115 kDa και των μυκήτων *P. decumbens*, *A. niger* NII-08121, *P. funiculosus* και *Penicillium janthinellum* έχουν 120 kDa (Ahmed et al., 2017). Ακόμη προσδιορίστηκαν η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης ίση με 60 °C. Οι β-γλυκοζιδάσες μυκητιακής προέλευσης εμφανίζουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης μεταξύ 40 και 80 °C (Ahmed et al., 2017). Για παράδειγμα οι β-γλυκοζιδάσες από *Lichtheimia corymbifera* και *Byssosclamyces spectabilis* έχουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης 55 °C και 50 °C αντίστοιχα (de Morais et al., 2018) ενώ η β-γλυκοζιδάση του *Thermoascus auranticus* εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία ίση με 80 °C (Parry et al., 2001). β-γλυκοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη του γένους *Aspergillus* (π.χ. *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*,) εμφανίζουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στο εύρος 50-70 °C (Gong et al., 2014, Nagayoshi, et al., 2011, Riou et al., 1998, Liu et al., 2012) ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της β-γλυκοζιδάσης από το μύκητα *Paecilomyces bainier* βρέθηκε ίση με 60 °C (Yan et al., 2008). Το βέλτιστο pH δράσης της β-γλυκοζιδάσης βρέθηκε ίσο με 4.5. β-γλυκοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη του γένους *Aspergillus* (π.χ. *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*,) εμφανίζουν βέλτιστο pH δράσης στο εύρος 4.0-6.0 (Gong et al., 2014, Nagayoshi, et al., 2011, Riou et al., 1998, Liu et al., 2012). Το βέλτιστο pH δράσης β-γλυκοζιδάσων από *L. corymbifera*, *B. spectabilis*, *T. auranticus* και *P. bainier* βρέθηκε ίσο με 4.5, 4.0, 4.5 και 3.5 αντίστοιχα (de Morais et al., 2018, Parry et al., 2001, Yan et al., 2008).

Το ένζυμο βρέθηκε ότι ήταν σταθερό μετά από επώαση για 24 ώρες στους 4 °C σε pH 4.5-6.0. Οι β-γλυκοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από τους μύκητες *L. corymbifera* και *B. Spectabilis* είναι σταθερές σε ένα εύρος pH 4.0-7.0 και 4.0-6.0, αντίστοιχα (de Morais et al., 2018). Άλλες β-γλυκοζιδάσες που έχουν χαρακτηριστεί από τον *P. funiculosus* NCL1 εμφανίζουν σταθερότητα σε pH 3.0-6.0 (Ramani et al., 2012) και από τον *A. oryzae* 4.5-10.0, 6.0-9.0 και 4.0-7.0 (Kudo et al., 2015). Από την μέτρηση της θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου παρατηρήθηκε ότι το ένζυμο απενεργοποιείται πλήρως σε χρόνο 10 λεπτών στους 70 και 80°C και σε χρόνο

περίπου 1.5 ώρας στους 60 °C. Στους 50°C είναι σχετικά σταθερό καθώς διατηρεί το 55% της αρχικής του ενεργότητας σε διάστημα 8 ωρών και στους 40 και 30°C είναι σταθερό με διατήρηση του 85 και 90% της αρχικής ενεργότητας, αντίστοιχα στο ίδιο χρονικό διάστημα.

Οι β-γλυκοζιδάσες από τους μύκητες *L. corymbifera* και *B. spectabilis* εμφανίζουν σταθερότητα σε θερμοκρασίες μέχρι 40 και 50 °C αντίστοιχα (de Morais et al., 2018). Η β-γλυκοζιδάση του *P. funiculosum* NCL1 παρουσιάζει σταθερότητα μέχρι τους 60 °C (Ramani et al., 2012) και του *A. oryzae* σε θερμοκρασίες κάτω από 50 °C (Kudo et al., 2015).

Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης της β-γλυκοζιδάσης (E , kJ/mol) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση του Arrhenius και βρέθηκε ίση με 139.02 kJ.mol⁻¹. Οι ενέργειες θερμικής απενεργοποίησης των β-γλυκοζιδάσων που απομονώθηκαν από τους μύκητες *T. aurantiacus*, *A. pullulans* και *A. niger* βρέθηκαν ίσες με 414 kJ.mol⁻¹, 537 kJ.mol⁻¹ και 388.6 kJ.mol⁻¹ αντίστοιχα. Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης β-γλυκοζιδάσων που απομονώθηκαν από τα βακτήρια *Bacillus* sp. SJ-10 και *Cellulomonas biazotea* βρέθηκαν ίσες με 729.52 kJ.mol⁻¹ και 88 kJ.mol⁻¹ αντίστοιχα (Lee et al., 2015; Rajoka et al., 2004). Επίσης ενέργειες θερμικής απενεργοποίησης ίσες με 89.9 kJ.mol⁻¹ και 246.7 kJ.mol⁻¹ βρέθηκαν για τις β-γλυκοζιδάσες των μικροοργανισμών *L. corymbifera* και *B. spectabilis* αντίστοιχα (de Morais et al. 2018). Όσο υψηλότερη είναι η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης τόσο σταθερότερη είναι η δομή του ενζύμου (Leite et al., 2007). Οι χρόνοι ημίσειας ζωής του ενζύμου στους 70 και 80°C υπολογίσθηκαν ίσοι με 5.7 και 3.7 min, αντίστοιχα, ενώ στους 50°C και 60°C βρέθηκαν ίσοι με 8.9 ώρες και 18.5 min αντίστοιχα. Οι τιμές των χρόνων υποδεκαπλασιασμού (D -value) στους 70 και 80°C έδειξαν ότι προκειμένου να μειωθεί η αρχική ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης κατά 90% απαιτούνται 18.8 και 12.3 min, αντίστοιχα. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής μιας εσωκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης από το βακτήριο *C. biazotea* σε θερμοκρασίες 55 °C και 60°C βρέθηκαν ίσοι με 8 και 4 h αντίστοιχα, ενώ της εξωκυτταρικής β-γλυκοζιδάσης από το μύκητα *A. niger* στους 55°C και 60°C βρέθηκαν ίσοι με 1925 min (32 h) και 408 min (6.8 h) αντίστοιχα (Rajoka et al., 2004; Rashid and Siddiqui, 1998). Τέλος οι de Morais et al., (2018) αναφέρουν ότι οι χρόνοι ημίσειας ζωής των

β-γλυκοζιδασών από *L. corymbifera* και *B. spectabilis* σε θερμοκρασία 50°C βρέθηκαν ίσοι με 16.6 min και 94.9 min, αντίστοιχα.

Ο υπολογισμός των θερμοδυναμικών παραμέτρων απενεργοποίησης παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου. Οι τιμές της ΔH^* σε εύρος θερμοκρασιών από 30 έως 80°C κυμάνθηκαν από 136.50 έως 136.08 kJ·mol⁻¹. Οι τιμές της ΔH^* για τη θερμική απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης του μύκητα *A. niger* για εύρος θερμοκρασιών 55 έως 70°C ήταν υψηλότερες αυτών της παρούσας εργασίας και κυμάνθηκαν από 385.87 έως 385.75 kJ·mol⁻¹ (Rashid and Siddiqui, 1998). Η μεταβολή της ΔH^* κατά τη θερμική απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης του θερμόφιλου μύκητα *T. aurantiacus* για εύρος θερμοκρασιών 80°C έως 87.5°C βρέθηκε 411.46-411.40 kJ·mol⁻¹ ενώ για το ίδιο εύρος θερμοκρασιών η β-γλυκοζιδάση του μεσόφιλου μύκητα *A. pullulans* βρέθηκαν 534.12-534.06 kJ·mol⁻¹ (Leite et al., 2007). Η μεταβολή της ΔH^* κατά τη θερμική απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης του *Bacillus* sp. SJ-10 για εύρος θερμοκρασιών 40-50°C κυμάνθηκε από 726.94 έως 726.84 kJ·mol⁻¹ (Lee et al., 2015). Οι Rajoka et al., (2004) μελετώντας τη θερμική απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης του *Cellulomonas biazotea* αναφέρουν ότι οι τιμές της ΔH^* σε εύρος θερμοκρασιών από 40 έως 60°C κυμάνθηκαν από 65.4 έως 65.3 kJ·mol⁻¹.

Οι τιμές της ΔS^* που υπολογίστηκαν για κάθε θερμοκρασία ήταν θετικές γεγονός που υποδεικνύει δεν υπάρχουν διαδικασίες συσσωμάτωσης, γιατί αν συνέβαινε αυτό οι τιμές θα ήταν αρνητικές (Ortega et al., 2004), όπως στην περίπτωση της β-γλυκοζιδάσης του *C. biazotea* (Rajoka et al., 2004) (οι τιμές της ΔS^* κυμάνθηκαν από -141 έως -132 J·mol⁻¹ ·K⁻¹). Επιπλέον οι υπολογισθείσες τιμές δεν εμφανίζουν κάποια συγκεκριμένη τάση. Παρόμοια διακύμανση εμφάνισαν οι τιμές της ΔS^* κατά τη θερμική απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης του μύκητα *A. niger* (Rashid and Siddiqui, 1998) καθώς και της β-γλυκοζιδάσης του *Bacillus* sp. SJ-10 (Lee et al., 2015). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ειδικά για την β-γλυκοζιδάση του *Bacillus* sp. SJ-10 η μέση τιμή της ΔS^* ήταν αρκετά υψηλή (2103.25 J·mol⁻¹ ·K⁻¹). Αντίθετα οι τιμές της ΔS^* εμφάνισαν σταθερότητα σε όλο το εύρος των εξετασθέντων θερμοκρασιών που μελετήθηκαν για την απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης του θερμόφιλου μύκητα *T. aurantiacus* (περίπου 888.32 J·mol⁻¹ ·K⁻¹) καθώς και της β-γλυκοζιδάσης

του μεσόφιλου μύκητα *A. pullulans* (περίπου $1225.17 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) (Leite et al., 2007).

Η τιμή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG^*) σχετίζεται άμεσα με την σταθερότητα της πρωτεΐνης. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της ΔG^* , τόσο μεγαλύτερη είναι και η σταθερότητα του ενζύμου. Οι τιμές της ΔG^* παρουσίασαν μία ελαφρά αύξηση αυξανόμενης της θερμοκρασίας έως τους 50°C , ακολουθούμενη από μείωση με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας. Παρόμοια διακύμανση στις τιμές της ΔG^* αναφέρθηκε από τους Rajoka et al., (2004) κατά τη μελέτη της θερμικής απενεργοποίησης της β-γλυκοζιδάσης του *C. biazotea*. Η μεταβολή της ΔG^* κατά τη θερμική απενεργοποίηση της β-γλυκοζιδάσης παρουσίασε μείωση με αύξηση της θερμοκρασίας για τα ένζυμα των *Bacillus* sp. SJ-10, (από $69.07 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ στους 40°C σε $47.92 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ στους 50°C) (Lee et al., 2015), *A. niger* (από $113.38 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ στους 55°C σε $102.12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ στους 70°C) (Rashid and Siddiqui, 1998), *T. aurantiacus* (από $97.76 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ στους 80°C σε $91.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ στους 87.5°C), *A. pullulans* (από $101.63 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ στους 80°C σε $92.38 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ στους 87.5°C) (Leite et al., 2007).

Υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές K_m και V_{max} για τα υποστρώματα pNPG και κελλοβιόζη. Οι τιμές των σταθερών είναι 0.68 mM και $4.52 \text{ mmole/mg protein/min}$ και 3.45 mM και $0.058 \text{ mmole/mg protein/min}$ για το pNPG και την κελλοβιόζη αντίστοιχα. Η γλυκοζιδάση παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση στο pNPG σε σχέση με την κελλοβιόζη, όπως προκύπτει από το λόγος καταλυτικής αποδοτικότητας k_{cat}/K_m , ο οποίος είναι πολύ μεγαλύτερος στο pNPG (12186.3 για το pNPG και 156.4 για την κελλοβιόζη). Η β-γλυκοζιδάση από τον *Aspergillus niger* παρουσιάζει υψηλότερη τιμή K_m ίση με 3.11 mM (Zahoor et al., 2011) για την υδρόλυση του pNPG. Χαμηλότερες τιμές έχουν εμφανίσει οι β-γλυκοζιδάσες από τους μύκητες *Penicillium piceum* (Cel3E), 0.0019 mM (Gao et al., 2014), *Trichoderma reesei* (Cel3A), 0.14 mM (Chen et al., 1992) και *Penicillium decumbens* (Cel3A), 0.006 mM (Chen et al., 2010). Παρόμοια τιμή επιτεύχθηκε από τους Vaheri et al. (1979) από τον *Aspergillus niger* (Cel3A) με τιμή K_m ίση με 0.57 mM .

Τέλος, μελετήθηκε η παρεμπόδιση του ενζύμου από το προϊόν, γλυκόζη. Το ένζυμο παρεμποδίζεται ισχυρά από την γλυκόζη, αφού περίπου το 20% της αρχικής ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης ανακτάται παρουσία 40 mM γλυκόζης. Η

πλειοψηφία των μικροβικών β-γλυκοζιδασών παρεμποδίζονται από την γλυκόζη, γεγονός που αποτελεί το σημαντικότερο πρόβλημα κατά την υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων. Η συσσώρευση γλυκόζης μειώνει σημαντικά το ρυθμό υδρόλυσης της κυτταρίνης. Η έκταση της παρεμπόδισης των διαφόρων β-γλυκοζιδασών από τη γλυκόζη ποικίλλει ακόμα και μεταξύ ενζύμων που προέρχονται από το ίδιο μυκητιακό είδος (Sørensen et al., 2011). Οι β-γλυκοζιδάσες των μυκήτων *L. corymbifera* και *B. Spectabilis* εμφανίζουν περίπου το 50% των αρχικών ενεργοτήτων τους σε συγκέντρωση 50 και 30 mM γλυκόζης, αντίστοιχα (de Morais et al., 2018).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdella A, Mazeed TE-S, El-Baz AF, Yang S-T (2016): Production of β -glucosidase from wheat bran and glycerol by *Aspergillus niger* in stirred tank and rotating fibrous bed bioreactors. *Process Biochemistry* 2016, 51(10)
- Abdel-Naby M A, Osman M Y, Abdel-Fattah A F (1999): Purification and properties of three cellobiases from *Aspergillus niger* A20. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1999, 76(1):33-44
- Acuña-Argüelles M, Gutiérrez-Rojas M, Viniestra-González G, Favela-Torres E (1995): Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied microbiology and biotechnology* 1995, 43(5):808-14
- Agrawal R, Satlewal A, Verma A K (2013): Development of a β -glucosidase hyperproducing mutant by combined chemical and UV mutagenesis. *3 Biotech* 2013, 3(5): 381-388
- Ahmed A, Aslam M, Ashraf M, Nasim F H, Batool K, and Bibi A (2017): Microbial β -Glucosidases: Screening, Characterization, Cloning and Applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 2017, 5(2):57-73
- Ahmed A, Nasim F H, Batool K, Bibi A (2017): Microbial β -Glucosidase: Sources, Production and Applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 2017, 5(1):31-46
- Ait N, Creuzet N, Cattaneo J (1982): Properties of β -glucosidase purified from *Clostridium thermocellum*. *Microbiology* 1982, 128:569-577
- Albaser A, Kazana E, Bennett M H, Cebeci F, Luang-In V, Spanu PD, Rossiter J T (2016): Discovery of a Bacterial Glycoside Hydrolase Family 3 (GH3) β -Glucosidase with Myrosinase Activity from a *Citrobacter* Strain Isolated from Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2016, 64(7): 1520-1527.
- An D S, Cui C H, Lee H G, Wang L, Kim S C, Lee S T, Jin F, Yu H, Chin Y W, Lee H K (2010): Identification and characterization of a novel *Terrabacter ginsenosidimutans* sp. nov. β -glucosidase that transforms ginsenoside Rb1 into the rare gypenosides XVII and LXXV. *Applied and Environmental Microbiology* 2010, 76(17): 5827-5836

Baraldo A J, Borges D G, Tardioli P W, Farinas C S (2014): Characterization of β -Glucosidase Produced by *Aspergillus niger* under Solid-State Fermentation and Partially Purified Using MANAE-Agarose. Biotechnology Research International 2014, 2014

Bai H, Wang H, Sun J, Irfan M, Han M, Huang Y, Han X, Yang Q (2013): Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. EXCLI Journal 2013, 12: 528.

Batra J, Beri D, Mishra S (2014): Response Surface Methodology Based Optimization of β -Glucosidase Production from *Pichia pastoris*. Applied Biochemistry and Biotechnology 2014, 172(1): 380-393

Bhat K M, Gaikwad J S, Maheshwari R (1993): Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* and its influence on cellulase activity. Microbiology 1993, 139(11): 2825-2832.

Bhatia Y, Mishra S & Bisaria V S (2002): Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications. Critical Reviews in Biotechnology 2002, 22(4):375-407

Bhatti H N, Batool S, Afzal N (2013): Production and Characterization of a Novel β -Glucosidase from *Fusarium solani*. International Journal of Agriculture & Biology 2013, 15(1)

Brijwani K, Vadlani P V (2011): Cellulolytic enzymes production via solid-state fermentation: effect of pretreatment methods on physicochemical characteristics of substrate. Enzyme research 2011, 2011

Cairns J R K, Esen A (2010) β -Glucosidases. Cellular and Molecular Life Sciences 2010, 67:3389–3405

Carvalho M L A, Carvalho D F, Gomes E B, Maeda R N, Santa Anna L M M, Castro A M, Pereira Jr N (2014): Optimisation of cellulase production by *Penicillium funiculosum* in a stirred tank bioreactor using multivariate response surface analysis. Enzyme Research 2014, 703291: 1–8.

Chang K H, Jo M N, Kim K T, Paik H D (2012): Purification and characterization of a ginsenoside Rb1-hydrolyzing β -glucosidase from *Aspergillus niger* KCCM 11239. International Journal of Molecular Sciences 2012, 13(9): 12140-12152.

Chang M Y, Kao H C, Juang R S (2007): Thermal inactivation and reactivity of β -glucosidase immobilized on chitosan–clay composite. International Journal of Biological Macromolecules 2007, 43(2008): 48–53

- Chen H L, Chen Y C, Lu M YJ, Chang J J, Wang H TC, Ke H M, Wang T Y, Ruan S K, Wang T Y, Hung K Y, Cho H Y, Lin W T, Shih M C, Li W H (2012): A highly efficient β -glucosidase from the buffalo rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5. *Biotechnology for Biofuels* 2012, 5(1): 24
- Chen H, Hayn M, Esterbauer H (1992): Purification and characterization of two extracellular β -glucosidases from *Trichoderma reesei*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1992, 1121(1-2): 54-60
- Chen M, Qin Y, Liu Z, Liu K, Wang F, Qu Yn (2010): Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme and Microbial Technology* 2010, 46(6): 444-449.
- Choi J Y, Park A R, Kim Y J, Kim J J, Cha C J, Yoon J J(2011): Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase produced by *Phoma* sp. KCTC11825BP isolated from rotten mandarin peel. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2011, 21(5): 503-508
- Christakopoulos P, Goodenough PW, Kekos D, Macris BJ, Claeysens M, Bhat MK (1994): Purification and Characterisation of an Extracellular β -Glucosidase with Transglycosylation and Exo-glucosidase Activities from *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Biochemistry* 1994, 224(2): 379-385
- Collins T, Gerday C, Feller G (2005): Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 2005, 29(1): 3-23
- Coradi G V, Da Visitação V L, De Lima E A, Saito L Y T, Palmieri D A, Takita M A, De Oliva Neto P, De Lima V M G (2012): Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. *Annals of Microbiology* 2013, 63(2): 533-540
- Crespim E, Zanthorlin L M, de Souza F H, Diogo J A, Gazolla A C, Machado C B, Figueiredo F, Sousa A S, Nóbrega F, Pellizari V H (2016): A novel cold-adapted and glucose-tolerant GH1 β -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016, 82: 375-380.
- Cristóbal HA, Schmidt A, Kothe E, Breccia J, Abate CM (2009): Characterization of inducible cold-active β -glucosidases from the psychrotolerant bacterium *Shewanella* sp. G5 isolated from a sub-Antarctic ecosystem. *Enzyme and Microbial Technology* 2009, 45(6): 498-506

Daroit D J, Simonetti A, Hertz P F, Brandelli A (2008): Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from *Monascus purpureus*. Journal of Microbiology and Biotechnology 2008, 18(5): 933-941

de Moraes T P, Gomes Barbosa P M, Lisboa Garcia N F, Gonsales da Rosa-Garzon N, Fonseca G G, Fossa da Paz M, Cabral H & Ribeiro Leite R S (2018): Catalytic and thermodynamic properties of β -glucosidases produced by *Lichtheimia corymbifera* and *Byssoschlamys spectabilis*, Preparative Biochemistry and Biotechnology 2018, 48

De Palma-Fernandez E, Gomes E, Da Silva R (2002): Purification and characterization of two β -glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Folia Microbiologica 2002, 47(6): 685-690.

Deschrevel B, Vincent J C, Ripoll C, Thellier M (2003): Thermodynamic parameters monitoring the equilibrium shift of enzyme-catalyzed hydrolysis/synthesis reactions in favor of synthesis in mixtures of water and organic solvent. Biotechnology and Bioengineering 2003, 81(2): 167-177.

Dhake A, Patil M (2005): Production of β -Glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. Brazilian Journal of Microbiology 2005, 36(2): 170-176

Dikshit R, Tallapragada P (2015): Partial Purification and Characterization of β -glucosidase from *Monascus sanguineus*. Brazilian Archives of Biology and Technology 2015, 58(2): 185-191

Du J, Cui C H, Park S C, Kim J K, Yu H S, Jin F X, Sun C, Kim S C, Im W T (2014): Identification and Characterization of a Ginsenoside-Transforming β -Glucosidase from *Pseudonocardia* sp. Gsoil 1536 and Its Application for Enhanced Production of Minor Ginsenoside Rg 2 (S). PLoS ONE 2014, 9(6): e96914.

Elíades L A, Rojas N L, Cabello M N, Voget C E, Saparrat M C N (2011): α -L-Rhamnosidase and β -D-glucosidase activities in fungal strains isolated from alkaline soils and their potential in naringin hydrolysis. Journal of Basic Microbiology 2011, 51(6): 659-665.

Fang W, Song R, Zhang X, Zhang X, Zhang X, Wang X, Fang Z, Xiao Y (2014): Characterization of a novel β -glucosidase from *Gongronella* sp. W5 and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2014, 62(48): 11688-11695.

Gao L, Gao F, Jiang X, Zhang C, Zhang D, Wang L, Wu G, Chen S (2014): Biochemical characterization of a new β -glucosidase (Cel3E) from *Penicillium piceum* and its application in boosting

lignocelluloses bioconversion and forming disaccharide inducers: New insights into the role of β -glucosidase. *Process Biochemistry* 2014, 49(2014): 768–774

Gao Z, Duong V, Le Thi HY, Katsuhiko A, Shuichi H, Ryuichiro K (2012): The production of β -glucosidases by *Fusarium proliferatum* NBRC109045 isolated from Vietnamese forest. *AMB Express* 2012, 2(1): 49

Garcia N F L, da Silva Santos F R, Gonçalves F A, da Paz M F, Fonseca G G, Leite R S R (2015): Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electronic Journal of Biotechnology* 2015, 18(4): 314-319.

Gong G, Zheng Z, Liu H, Wang L, Diao J, Wang P, Zhao G (2014): Purification and characterization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* and its application in the hydrolysis of geniposide to genipin. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2014, 24(6): 788-794.

Gueguen Y, Chemardin P, Labrot P, Arnaud A, Galzy P (1997): Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from a new strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from cassava. *Journal of Applied Microbiology* 1997, 82(4): 469-476.

Günata Z, Vallier M J (1999): Production of a highly glucose-tolerant extracellular β -glucosidase by three *Aspergillus* strains. *Biotechnology letters* 1999, 21(3): 219-223

Guo B, Amano Y, Nozaki K (2016): Improvements in Glucose Sensitivity and Stability of *Trichoderma reesei* β -Glucosidase Using Site-Directed Mutagenesis. *PLoS ONE* 2016, 11(1): e0147301.

Hassan N, Nguyen T H, Intanon M, Kori L D, Patel B K, Haltrich D, Divne C, Tan T C (2015): Biochemical and structural characterization of a thermostable β -glucosidase from *Halothermothrix orenii* for galacto-oligosaccharide synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2015, 99(4): 1731-1744.

Hernández L F, Espinosa J C, Fernández-González M, Briones A (2003): β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology* 2003, 80(2): 171-176

Hernández-Guzmán A, Flores-Martínez A, Ponce-Noyola P, Villagómez-Castro J C (2016): Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Sporothrix schenckii*. *FEBS Open Bio* 2016, 6(11): 1067-1077

Hölker U, Lenz J (2005): Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology* 2005, 8(3): 301-306

Hong M R, Kim Y S, Park C S, Lee J K, Kim Y S, Oh D K (2009): Characterization of a recombinant β -glucosidase from the thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2009, 108(1): 36-40.

Hong J, Tamaki H, Kumagai H (2007): Cloning and functional expression of thermostable β -glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007, 73(6): 1331-1339.

Hrmova M, Harvey A, Wang J, Shirley N J, Jones G, Stone B A, Hoj P B, Fincher G B (1996): Barley beta-D-glucan exohydrolases with beta-D-glucosidase activity. Purification, characterization, and determination of primary structure from a cDNA clone. *Journal of Biological Chemistry* 1996, 271(9): 5277-5286

Iembo T, Da Silva R, Pagnocca F, Gomes E (2002): Production, Characterization, and Properties of β -Glucosidase and β -Xylosidase from a Strain of *Aureobasidium* sp. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2002, 38(6): 549-552

Irshad M, Anwar Z, Ramzan M, Mahmood Z, Nawaz H (2013): Characterization of Purified β -Glucosidase Produced from *Trichoderma Viride* through Bio-Processing of Orange Peel Waste. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 2013, 04(10):941-944

Ismail S A, Sahab A F, Darwish S S (2007): Factors affecting cellulase and β -glucosidase activities of *Fusarium oxysporum* isolated from old documents. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 2007, 2:689–695.

Iwashita K, Nagahara T, Kimura H, Takano M, Shimoi H, Ito K (1999): The bglA Gene of *Aspergillus kawachii* Encodes Both Extracellular and Cell Wall-Bound β -Glucosidases. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65(12): 5546-5553

Jabbour D, Klippel B, Antranikian G (2012): A novel thermostable and glucose-tolerant β -glucosidase from *Fervidobacterium islandicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012, 93(5): 1947-1956.

Jager S, Braumber A, Feher E, Reczey K, Kiss L (2001): Production and characterization of β -glucosidase from different *Aspergillus* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2001, 17: 455–461.

Jeya M, Joo A R, Lee K M, Tiwari M K, Kim S H, Lee J K (2010): Characterization of β -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010, 86(5): 1473-1484.

Jeya M, Lee J-K (2013): Optimization of β -glucosidase production by a strain of *Stereum hirsutum* and its application in enzymatic saccharification. *J Microbiol Biotechnol* 2013, 23(3): 351-356

Jiang C, Li S X, Luo F F, Jin K, Wang Q, Hao Z Y, Wu L L, Zhao G C, Ma G F, Shen P H (2011): Biochemical characterization of two novel β -glucosidase genes by metagenome expression cloning. *Bioresource Technology* 2011, 102(3): 3272-3278.

Joo A R, Jeya M, Lee K M, Lee K M, Moon H J, Kim Y S, Lee J K (2010): Production and Characterization of β 1,4- Glucosidase from a Strain of *Penicillium Pinophilum*. *Process Biochemistry* 2010, 45(6):851–858.

Kalyani D, Lee K M, Tiwari M K, Ramachandran P, Kim H, Kim I W, Jeya M, Lee J K (2012): Characterization of a recombinant aryl β -glucosidase from *Neosartorya fischeri* NRRL181. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012, 94(2): 413-423

Kamaruddin S, Bakar F D A, Illias R, Said M, Hassan O, Murad A M A (2015): Overexpression, purification and characterization of *Aspergillus niger* Beta-Glucosidase in *Pichia pastoris*. *Malaysian Applied Biology* 2015, 44(1): 7-11.

Karnaouri A, Topakas E, Paschos T, Taouki I, Christakopoulos P (2013): Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3 β -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. *PeerJ* 2013, 1: e46.

Karnchanatat A, Petsom A, Sangvanich P, Piaphukiew J, Whalley AJ, Reynolds CD, Sihanonth P (2007): Purification and biochemical characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.: Fr.) Rehm. *FEMS Microbiology Letters* 2007, 270(1): 162-170

Kaur J, Chadha B S, Kumar B A, Kaur G, Saini H S (2007): Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Electronic Journal of Biotechnology* 2007, 10(2): 260-270.

Kengen S, Luesink E J, Stams A J, Zehnder A J (1993): Purification and characterization of an extremely thermostable β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *European Journal of Biochemistry* 1993, 213(1): 305-312

Kovács K, Megyeri L, Szakacs G, Kubicek C P, Galbe M, Zacchi G (2008): *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β -glucosidase on pretreated willow. *Enzyme and Microbial Technology* 2008, 43(1): 48-55

Krisch J, Bencsik O, Papp T, Vágvölgyi C, Takó M (2012): Characterization of a β -glucosidase with transgalactosylation capacity from the zygomycete *Rhizomucor miehei*. *Bioresource Technology* 2012, 114: 555-560.

Kudo K, Watanabe A, Ujii S, Shintani T, Gomi K (2015): Purification and enzymatic characterization of secretory glycoside hydrolase family 3 (GH3) aryl β -glucosidases screened from *Aspergillus oryzae* genome. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2015, 120(6), 614-623

Kuo L C, Lee K T (2007): Cloning, expression, and characterization of two β -glucosidases from isoflavone glycoside-hydrolyzing *Bacillus subtilis* natto. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 56(1): 119-125.

Kun L Y (2003): *Microbial biotechnology: principles and applications*: World Scientific

Lan T Q, Wei D, Yang S T, Liu X (2013): Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. *Bioresource Technology* 2013, 133: 175–182.

Lau A T Y, Wong W K R (2001): Purification and Characterization of a Major Secretory Cellobiase, Cba2, from *Cellulomonas biazotea*. *Protein Expression and Purification* 2001, 23(1): 159-166.

Lee L M, Kim Y R, Kim J K (2015): Characterization of salt-tolerant β -glucosidase with increased thermostability under high salinity conditions from *Bacillus* sp. SJ-10 isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2015, 38:1335–1346

Leite R S R, Gomes E, da Silva R (2007): Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry* 2007, 42: 1101–1106

- Lin J, Pillay B, Singh S (1999): Purification and biochemical characteristics of β -D-glucosidase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1999, 30(1): 81-87
- Ling H, Ge J, Ping W, Xu X (2011): Fermentation optimization by response surface methodology for enhanced production of beta-glucosidase of *Aspergillus niger* HDF05. *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology* 2011, 27(3): 419-426
- Liu D, Zhang R, Yang X, Zhang Z, Song S, Miao Y, Shen Q (2012): Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial Cell Factories* 2012, 11: 25
- Ma Z, Lan X, Tang J, Xu J, Xie J, Chen Q, Pan G, Li C, Zhou Z (2015): Molecular cloning and characterization of a novel alkaline β -glucosidase encoding gene (kpYBDN) from *Klebsiella pneumoniae*, performing a conserved function in bacteria. *International Journal of Agriculture and Biology* 2015, 17(5): 983-989.
- Magalhaes P, Ferraz A, Milagres A (2006): Enzymatic properties of two β -glucosidases from *Ceriporiopsis subvermispora* produced in biopulping conditions. *Journal of Applied Microbiology* 2006, 101(2): 480-486.
- Mahapatra S, Vickram AS, Sridharan TB, Parameswari R, Pathy MR (2016): Screening, production, optimization and characterization of β -glucosidase using microbes from shellfish waste. *3 Biotech* 2016, 6(2): 213.
- Mallerman J, Papinutti L, Levin L (2015): Characterization of β -Glucosidase Produced by the White Rot Fungus *Flammulina velutipes*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2015, 25(1): 57-65.
- Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D et al (2008): Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology* 2008, 26(5): 553-560
- Melikoglu M, Lin CSK, Webb C (2013): Stepwise optimisation of enzyme production in solid state fermentation of waste bread pieces. *Food and Bioproducts Processing* 2013, 91(4): 638-646
- Michlmayr H, Kneifel W (2014): β -Glucosidase activities of lactic acid bacteria: mechanisms, impact on fermented food and human health. *FEMS Microbiology Letters* 2014, 352(1): 1-10

Michlmayr H, Schümann C, Barreira Braz Da Silva N, Kulbe K, Del Hierro A (2010): Isolation and basic characterization of a β -glucosidase from a strain of *Lactobacillus brevis* isolated from a malolactic starter culture. *Journal of Applied Microbiology* 2010, 108(2): 550-559

Narasimha G, Sridevi A, Ramanjaneyulu G, Rajasekhar Reddy B (2016): Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Aspergillus niger*. *International Journal of Food Properties* 2016, 19(3): 652-661.

Naz S, Ikram N, Rajoka M, Sadaf S, Akhtar M (2010): Enhanced production and characterization of a β -glucosidase from *Bacillus halodurans* expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscow)* 2010, 75(4): 513-518.

Ng I S, Li C W, Chan S P, Chir J L, Chen P T, Tong C G, Yu S M, Ho T H D (2010): High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource Technology* 2010, 101(4): 1310-1317

Nijikken Y, Tsukada T, Igarashi K, Samejima M, Wakagi T, Shoun H, Fushinobu S (2007): Crystal structure of intracellular family 1 β -glucosidase BGL1A from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS letters* 2007, 581(7): 1514-1520

Okamoto K, Nakano H, Yatake T, Kiso T, Kitahata S (2000): Purification and some properties of a β -glucosidase from *Flavobacterium johnsonae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2000, 64(2): 333-340

Olajuyigbe F M, Nlekerem C M, Ogunyewo O A (2016): Production and Characterization of Highly Thermostable β -Glucosidase during the Biodegradation of Methyl Cellulose by *Fusarium oxysporum*. *Biochemistry research international* 2016, 2016(1):1-8

Paavilainen S, Hellman J, Korpela T (1993): Purification, characterization, gene cloning, and sequencing of a new beta-glucosidase from *Bacillus circulans* subsp. *alkalophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 1993, 59(3): 927-932

Pandey A, Selvakumar P, Soccol C, Nigam P (1999): Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science* 1999, 77(1): 149-162

Park A R, Hong J H, Kim J J, Yoon J J (2012): Biochemical characterization of an extracellular β -glucosidase from the fungus, *Penicillium italicum*, isolated from rotten citrus peel. *Mycobiology* 2012, 40(3): 173-180

Parry N J, Beever D E, Owen E, Vandenberghe I, Van Beeumen J (2001): Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. Biochemical journal 2001, 353(1): 117-127

Pei J, Pang Q, Zhao L, Fan S, Shi H (2012): *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* β -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. Biotechnology for Biofuels 2012, 5(1): 1.

Pitson S M, Seviour R J, McDougall B M (1997): Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in β -glucan degradation. Enzyme and Microbial Technology 1997, 21(3): 182-190

Rajasree K P, Mathew G M, Pandey A, Sukumaran R K (2013): Highly glucose tolerant β -glucosidase from *Aspergillus unguis*: NII 08123 for enhanced hydrolysis of biomass. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 2013, 40(9): 967-975.

Rajoka M I, Akhtar M W, Hanif A, Khalid A (2006): Production and characterization of a highly active cellobiase from *Aspergillus niger* grown in solid state fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2006, 22(9): 991-998.

Rajoka M I, Durrani I S, Khalid A M (2003): Kinetics of improved production and thermostability of an intracellular β -glucosidase from a mutant-derivative of *Cellulomonas biazotea*. Biotechnology Letters 2004, 26: 281–285

Rajoka M, Khan S, Latif F, Shahid R (2004): Influence of carbon and nitrogen sources and temperature on hyperproduction of a thermotolerant β -glucosidase from synthetic medium by *Kluyveromyces marxianus*. Applied Biochemistry and Biotechnology 2004, 117(2): 75-92.

Ramachandran P, Nguyen N P, Choi J H, Kang Y C, Jeya M, Lee J K (2013): Optimization of β -glucosidase production by a strain of *Stereum hirsutum* and its application in enzymatic saccharification. Journal of Microbiology and Biotechnology 2013, 23(3): 351-356

Ramani G, Meera B, Vanitha C, Rao M, Gunasekaran P (2012): Production, purification, and characterization of a β -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. Applied Biochemistry and Biotechnology 2012, 167(5): 959-972

Rani V, Mohanram S, Tiwari R, Nain L, Arora A (2014): Beta-Glucosidase: Key Enzyme in Determining Efficiency of Cellulase and Biomass Hydrolysis. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques* 2014, 5:197

Ranjitha P, Karthy E, Mohankumar A (2009): Purification and Characterization of the Lipase from Marine *Vibrio fischeri*. *International Journal of Biology* 2009, 1(2): 48.

Rashid M H, Siddiqui K S (1997): Thermodynamic and kinetic study of stability of the native and chemically modified β -glucosidases from *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* 1998, 33(2): 109-115

Ravindran C, Varatharajan G R, Karthikeyan A (2011): Role of alkaline-tolerant fungal cellulases in release of total antioxidants from agro-wastes under solid state fermentation. 2011, *BioResource*. 6, 3142-3154.

Raza F, Raza N A, Hameed U (2012): Solid state fermentation for the production of β -glucosidase by co-culture of *Aspergillus niger* and *A. oryzae*. *Pakistan Journal of Botany* 2011, 43: 75-83.

Riou C, Salmon J-M, Vallier M-J, Günata Z, Barre P(1998): Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64(10): 3607-3614

Rosi I, Vinella M, Domizio P (1994): Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology* 1994, 77(5): 519-527

Saha BC, Bothast RJ (1996): Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and Environmental Microbiology* 1996, 62(9): 3165-3170

Saha B C, Freer S N, Bothast R J (1994): Production, purification, and properties of a thermostable β -glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 1994, 60(10): 3774-3780.

Saloheimo M, Kuja-Panula J, Ylösmäki E, Ward M, Penttilä M (2002): Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -glucosidase BGLII (Cel1A). *Applied and Environmental Microbiology* 2002, 68(9): 4546-4553

Santos F, Garcia N F L, da Paz M F, Fonseca G G, Leite R S R (2016): Production and characterization of β -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology* 2016, 15(16): 633-641

Sengupta S, Ghosh A K, Sengupta S (1991): Purification and characterisation of a β -glucosidase (cellobiase) from a mushroom *Termitomyces clypeatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1991, 1076(2): 215-220.

Sharma B, Agrawal R, Singhania RR, Satlewal A, Mathur A, Tuli D, Adsul M (2015): Untreated wheat straw: Potential source for diverse cellulolytic enzyme secretion by *Penicillium janthinellum* EMSUV- 8 mutant. *Bioresource Technology* 2015, 196:518–524.

Shipkowski S, Brenchley J E (2005): Characterization of an unusual cold-active β -glucosidase belonging to family 3 of the glycoside hydrolases from the psychrophilic isolate *Paenibacillus* sp. strain C7. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, 71(8): 4225-4232.

Singhania R R (2012): Beta-Glucosidase from *Aspergillus niger* NII 08121-Molecular characterization and applications in Bioethanol production. Cochin University of Science and Technology, Cochin, India 2012

Singhania R R, Patel A K, Sukumaran R K, Larroche C, Pandey A (2013): Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology* 2013, 127: 500-507

Singhania R R, Sukumaran R K, Rajasree K P, Mathew A, Gottumukkala L, Pandey A (2011): Properties of a major β -glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. *Process Biochemistry* 2011, 46(7): 1521-1524

Singhania R R, Sukumarana R K, Patelb A K, Larrocheb C, Pandeya A (2010): Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 2010, 46(7):541-549

Sonia K, Chadha B, Badhan A, Saini H, Bhat M (2008): Identification of glucose tolerant acid active β -glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008, 24(5): 599-604

Sørensen A, Ahring B K, Lübeck M, Ubhayasekera W, Bruno K S, Culley D E, Lübeck P S (2012): Identifying and characterizing the most significant β -glucosidase of the novel species *Aspergillus saccharolyticus*. Canadian Journal of Microbiology 2012, 58(9): 1035-1046

Sørensen A, Andersen J J, Ahring B K, Teller P J, Lübeck M (2014): Screening of carbon sources for beta-glucosidase production by *Aspergillus saccharolyticus*. International Biodeterioration & Biodegradation 2014, 93: 78-8.

Spiridonov N A, Wilson D B (2001): Cloning and biochemical characterization of BglC, a β -glucosidase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. Current Microbiology 2001, 42(4): 295-301.

Srivastava S K, Ramachandran K B, Gopalkrishnan K S (1981): β -glucosidase production by *Aspergillus wentii* in stirred tank bioreactor. Biotechnology Letters 1981, 3: 477–480.

Stöckigt J, Zenk M H (1977): Strictosidine (isovincoside): the key intermediate in the biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications 1977, (18): 646-648.

Stutzenberger F (1990): Thermostable fungal β -glucosidases. Letters in Applied Microbiology 1990, 11(4): 173-178

Subramaniyam R, Vimala R (2012): Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. International Journal of Science and Nature 2012, 3: 480-486

Sukumaran R K, Singhania R R, Reeta & Pandey A (2005): Microbial cellulases-Production, applications and challenges. Journal of Scientific & Industrial Research 2005, 64(11):832-844

Sundarram A, Murthy T P K (2014): α -amylase production and applications: A review. Journal of Applied & Environmental Microbiology 2014, 2(4): 166-175

Tajima K, Nakajima K, Yamashita H, Shiba T, Munekata M, Takai M (2001): Cloning and sequencing of the beta-glucosidase gene from *Acetobacter xylinum* ATCC 23769. DNA Research 2001, 8(6): 263-269.

Tiwari P, Misra B, Sangwan N S (2013): β -Glucosidases from the fungus *Trichoderma*: an efficient cellulase machinery in biotechnological applications. BioMed Research International 2013, 2013.

Vaheri M P, Leisola M, Kaupinnen V (1979): Transglycosylation products of the cellulasesystem of *Trichoderma reesei*. Biotechnology Letters 1979, 1:41–6.

Vasconcellos V M, Tardioli P W, Giordano R L C, Farinas C S (2015): Production efficiency versus thermostability of (hemi)cellulolytic enzymatic cocktails from different cultivation systems. *Process Biochemistry* 2015, 50: 1701–1709.

Vaithanomsat P, Songpim M, Malapant T, Kosugi A, Thanapase W, Mori Y (2011): Production of β -glucosidase from a newly isolated *Aspergillus* species using response surface methodology. *International journal of microbiology* 2011, 2011.

Van Dyk J S, Pletschke B I (2012): A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances* 2012, 30(6):1458-80

Venturi L L, Polizeli M L, Terenzi H F, Furriel R, Jorge J A (2002): Extracellular β -D-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*: production, purification and some biochemical properties. *Journal of basic microbiology* 2002, 42(1): 55-66

Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar C N, de Jesus Romero-Gomez S, Diaz-Godinez G, Augur C (2003): Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 2003, 13(2): 157-167

Wierzbicka-Woś A, Bartasun P, Cieśliński H, Kur J (2013): Cloning and characterization of a novel cold-active glycoside hydrolase family 1 enzyme with β -glucosidase, β -fucosidase and β -galactosidase activities. *BMC Biotechnology* 2013, 13(1): 1.

Wright R M, Yablonsky M D, Shalita Z P, Goyal A, Eveleigh D (1992): Cloning, characterization, and nucleotide sequence of a gene encoding *Microbispora bispora* BglB, a thermostable beta-glucosidase expressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 1992, 58(11): 3455-3465.

Yadav S, Shruthi K, Prasad B S, Chandra M S (2016): Enhanced Production of β -glucosidase by New Strain *Aspergillus protuberus* on Solid State Fermentation in Rice Husk. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2016, 5(12): 551-564

Yan T R, Lin C L (1997): Purification and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1997, 61(6): 965-970.

Yang F, Yang X, Li Z, Du C, Wang J, Li S (2015): Overexpression and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *T. aotearoense* with high specific activity for cellobiose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2015, 99(21): 8903-8915.

Yang L, Ning Z S, Shi C Z, Chang Z Y, Huan L Y (2004): Purification and characterization of an isoflavone-conjugates-hydrolyzing β -glucosidase from endophytic bacterium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52(7): 1940-1944.

Yang S, Jiang Z, Yan Q, Zhu H (2007): Characterization of a thermostable extracellular β -glucosidase with activities of exoglucanase and transglycosylation from *Paecilomyces thermophila*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 56(2): 602-608.

Yang X, Ma R, Shi P, Huang H, Bai Y, Wang Y, Yang P, Fan Y, Yao B (2014): Molecular characterization of a highly-active thermophilic β -glucosidase from *Neosartorya fischeri* P1 and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. *PloS one* 2014, 9(9): e106785.

Yoon J J, Kim K Y, Cha C-J (2008): Purification and characterization of thermostable β -glucosidase from the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on microcrystalline cellulose. *The Journal of Microbiology* 2008, 46(1): 51-55

Zahoor S, Javed M M, Aftab M N, Latif F, Ikram-ul-Haq (2011): Metabolic engineering and thermodynamic characterization of an extracellular β -glucosidase produced by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology* 2011, 10(41): 8107-8116

Zahoor S, Javed M M, Aftab M N, Ikram-ul-Haq (2011): Cloning and expression of β -glucosidase gene from *Bacillus licheniformis* into *E. coli* BL 21 (DE3). *Biologia* 2011, 66(2): 213-220.

Zaidi K U, Ali A S, Ali S A (2014): Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzyme Research* 2014, 2014.

Zhang Y, Yuan L, Chen Z, Fu L, Lu J, Meng Q, He H, Yu X, Lin F, Teng L (2011): Purification and characterization of beta-glucosidase from a newly isolated strain *Tolypocladium cylindrosporum* Syzx4. *Chemical Research in Chinese Universities* 2011, 27: 557-561

Zhou Q, Xu J, Kou Y, Lv X, Zhang X, Zhao G, Zhang W, Chen G, Liu W (2012): Differential involvement of β -glucosidases from *Hypocrea jecorina* in rapid induction of cellulase genes by cellulose and cellobiose. *Eukaryotic cell* 2012, 11(11): 1371-1381

